

HERSTELLUNG VON OPTISCH AKTIVEN ORGANOPHOSPHATEN
MIT *cis*- UND *trans*-DECALINGERÜST
ZUR UNTERSUCHUNG DER INHIBITION VON
ACETYLCHOLINESTERASE MITTELS
ENZYMKINETIK UND ^{31}P -NMR SPEKTROSKOPIE

DISSERTATION

zur

Erlangung der wissenschaftlichen Doktorwürde

(Dr. sc. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Zürich

von

MICHAEL WÄCHTER

von

Unterbözüberg AG

Promotionskomitee

Prof. Dr. JOHN A. ROBINSON (Vorsitz)

Prof. Dr. PETER RÜEDI

Prof. Dr. JAY S. SIEGEL

Zürich 2009

Die vorliegende Arbeit wurde von der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Zürich
auf Antrag von Prof. Dr. JOHN A. ROBINSON und Prof. Dr. JAY S. SIEGEL
als Dissertation angenommen.

Für meine Eltern,
die mir ermöglicht haben,
etwas aus meinem Leben zu machen

und

für meine Frau,
die mit ihrer bedingungslosen Liebe
und ihrer Fröhlichkeit
stets mein Fels in der Brandung war.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2.	SUMMARY.....	2

THEORETISCHER TEIL

3.	EINLEITUNG.....	3
3.1	Die Acetylcholinesterase.....	3
3.2	Acetylcholinesterase-Inhibitoren.....	4
3.2.1	Reversible Acetylcholinesterase-Inhibitoren.....	4
3.2.2	Irreversible Acetylcholinesterase-Inhibitoren.....	6
3.2.3	Mechanismus der irreversiblen Inhibition der Acetylcholinesterase mit Organophosphorverbindungen.....	7
3.2.4	Atropin als Antidot.....	9
3.3	Weiteres zur Acetylcholinesterase.....	10
3.3.1	Struktur der Acetylcholinesterase aus <i>Torpedo californica</i>	10
3.3.2	Die <i>active site gorge</i>	11
3.3.3	Die katalytische Triade.....	11
3.3.4	Die "anionischen" Bindungsstellen.....	13
3.3.5	Das Oxyanion-Loch.....	14
3.4	Acetylcholinesterase aus <i>Electrophorus electricus</i>	14
4.	DAS FORSCHUNGSPROJEKT.....	16
4.1	Das Forschungsprojekt.....	16
4.2	Übersicht zu den bisherigen Arbeiten.....	23

4.3	Beweise für die kovalente Bindung der Inhibitoren an das <i>active site</i> Serin - einige Kontrollexperimente.....	30
4.4	Anwendung der ^{31}P -NMR Spektroskopie zur Strukturaufklärung.....	39
5.	EIGENE ARBEITEN.....	41
5.1	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	41
5.2	Enantiomerentrennung mit HPLC.....	42
5.2.1	Einige wichtige Kenngrößen der Chromatographie.....	45
5.2.2	HPLC-Trennung der <i>trans</i> - und <i>cis</i> -Diester.....	50
5.3	Bestimmung der absoluten Konfiguration der Diole.....	56
5.4	Synthese der optisch aktiven Acetylcholinmimetika.....	72
5.5	Synthese der racemischen, <i>N</i> -Allyl- Acetylcholinmimetika.....	75
5.5.1	Synthese des <i>cis</i> -1-Allyl-2-(2,2 dimethyl- propoxy-1-oxomethyl)piperidin-3-ols.....	75
5.5.2	Versuche zur Konfigurationsumkehr an C(3) und <i>cis/trans</i> -Equilibrierung via SWERN-Oxidation.....	76
5.5.3	Die <i>N</i> -allylierten Acetylcholinmimetika.....	80
5.6	Röntgenstrukturanalysen der Organophosphate.....	82
5.7	Konformationsanalyse der Organophosphate in Lösung.....	86
5.7.1	Der anomere Effekt.....	86
5.7.2	Modifizierte KARPLUS-Gleichung.....	88
5.7.3	Konformationsanalyse der F-axialen Decaline.....	90
5.7.4	Konformationsanalyse der F-equatorialen Organophosphate.....	92
5.7.5	Konformationsanalyse der F-equatorialen <i>trans</i> -Verbindungen.....	94
5.7.6	Konformationsanalyse der F-equatorialen <i>cis</i> -Verbindungen.....	98

5.8	Enzymkinetik, Neubeurteilung der kinetischen Mechanismen und der diagnostischen Methoden.....	107
5.8.1	Hintergrund.....	107
5.8.2	Allgemeines.....	107
5.8.3	Theoretische Betrachtung.....	108
5.8.3.1	Reversible (<i>slow-binding</i>) Inhibition.....	108
5.8.3.2	Enzyminaktivierung; Irreversible Inhibition.....	111
5.8.3.3	Unterscheidung der Mechanismen.....	115
5.8.3.4	Inhibition durch eine instabile Verbindung, Mechanismus 1B.....	120
5.8.3.5	Symbole und nomenklatorische Konventionen der Enzymkinetik.....	124
5.8.3.6	Repräsentative Beispiele.....	125
5.8.4	Weitere Kinetische Daten.....	134
5.9	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Untersuchungen an phosphorylierter AChE.....	139
5.9.1	Charakterisierung der ZSME-Modellverbindungen.....	139
5.9.2	Resultate der $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Experimente an phosphorylierter AChE und Bestimmung des stereochemischen Verlaufs der Inhibitionsreaktion.....	141
5.10	Übersicht zu den synthetisierten Verbindungen.....	150

EXPERIMENTELLER TEIL

6.	ALLGEMEINES.....	152
6.1	Abkürzungen.....	152
6.2	Chemikalien und Lösungsmittel.....	155
6.3	Handhabung der Substanzen.....	158
6.4	Bemerkungen zu den stereochemischen Angaben.....	159
6.5	Chromatographische Verfahren.....	159

6.6	Schmelzpunkte.....	161
6.7	pH-Messungen.....	161
6.8	Spektroskopische Methoden und Geräte.....	161
6.9	Röntgenstrukturanalysen.....	164
7.	ARBEITSVORSCHRIFTEN UND PHYSIKALISCHE DATEN.....	165
7.1	Herstellung der optisch aktiven <i>N</i> -benzylierten <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Diester.....	165
7.1.1	(+)- <i>trans</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-(Acetyloxy)-1-benzyl- piperidin-2-yl-methyl 2,2-Dimethylpropanoat	165
7.1.2	(-)- <i>trans</i> -(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3-(Acetyloxy)-1-benzyl- piperidin-2-yl-methyl 2,2-Dimethylpropanoat	166
7.1.3	(+)- <i>cis</i> -(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3-(Acetyloxy)-1-benzyl- piperidin-2-yl-methyl 2,2-Dimethylpropanoat.....	167
7.1.4	(-)- <i>cis</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-(Acetyloxy)-1-benzyl- piperidin-2-yl-methyl 2,2-Dimethylpropanoat	168
7.2	Herstellung der optisch aktiven <i>cis</i> -und <i>trans</i> -Diole.....	169
7.2.1	(+)- <i>trans</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-1-Benzyl-3-hydroxy- piperidin-2-methanol.....	169
7.2.2	(-)- <i>trans</i> -(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-1-Benzyl-3-hydroxy- piperidin-2-methanol.....	170
7.2.3	(-)- <i>cis</i> -(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-1-Benzyl-3-hydroxy- piperidin-2-methanol.....	171
7.2.4	(+)- <i>cis</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-Benzyl-3-hydroxy- piperidin-2-methanol.....	172
7.3	Synthese von MOSHER-Derivaten zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der Diole.....	174
7.3.1	(<i>S</i>)-Phenyllessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [<i>trans</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-1-benzyl-3((<i>S</i>)-2'-methoxy-1'-oxo-2'-	

	phenylpropoxy-2'-trifluoromethyl) piperidin] Methylester.....	174
7.3.2	(<i>R</i>)-Phenylelessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [<i>trans</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-1-benzyl-3((<i>R</i>)-2'-methoxy-1'-oxo-2'- phenylpropoxy-2'-trifluoromethyl) piperidin] Methylester.....	175
7.3.3	(<i>S</i>)-Phenylelessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [<i>cis</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-benzyl-3((<i>S</i>)-2'-methoxy-1'-oxo-2'- phenylpropoxy-2'-trifluoromethyl) piperidin] Methylester.....	177
7.3.4	(<i>R</i>)-Phenylelessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [<i>cis</i> -(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-1-benzyl-3((<i>R</i>)-2'-methoxy-1'-oxo-2'-phenylpropoxy- 2'-trifluoromethyl) piperidin] Methylester.....	178
7.3.5	(<i>R</i>)-Phenylelessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [<i>cis</i> -(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-1-benzyl-2-methylpivaloyl piperidin] Ester.....	179
7.3.6	(<i>R</i>)-Phenylelessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [<i>cis</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-benzyl-2-methylpivaloyl piperidin] Ester.....	181
7.4	Synthese der <i>N</i> -benzylierten optisch aktiven Acetylcholinmimetika.....	182
7.4.1	Dichlorfluorphosphat.....	182
7.4.2	(-)- <i>trans</i> -(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza- 7-benzyl-3-phospha-bicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	183
7.4.3	(-)- <i>trans</i> -(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza- 7-benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	185
7.4.4	(+)- <i>trans</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza- 7-benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	187
7.4.5	(+)- <i>trans</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza- 7-benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	187
7.4.6	(+)- <i>cis</i> -(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7- benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	188
7.4.7	(+)- <i>cis</i> -(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7- benzyl-3-phosphabicyclo-[4.4.0]decan 3-Oxid.....	190

7.4.8	(-)- <i>cis</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza- 7-benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	191
7.4.9	(-)- <i>cis</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza- 7-benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	192
7.5	Herstellung der racemischen <i>N</i> -allylierten Diolen.....	193
7.5.1	(±)- <i>cis</i> -(2 <i>RS</i> ,3 <i>RS</i>)-1-Allyl-2-(2,2 dimethyl- propoxy-1-oxomethyl)piperidin-3-ol	193
7.5.2	(±)- <i>cis/trans</i> -1-Allyl-2-(2,2 dimethyl- propoxy-1-oxo-methyl)piperidin-3-ol (1:1).....	194
7.5.3	(±)- <i>trans</i> -(2 <i>RS</i> ,3 <i>SR</i>)-1-Allyl-2-(2,2 dimethyl- propoxy-1-oxomethyl)piperidin-3-ol	195
7.5.4	(±)- <i>cis</i> -(2 <i>RS</i> ,3 <i>RS</i>)-1-Allyl-2-(2,2 dimethyl- propoxy-1-oxomethyl)piperidin-3-ol	196
7.5.5	(±)- <i>trans</i> -(2 <i>RS</i> ,3 <i>SR</i>)-1-Allyl-(2-hydroxy-methyl)piperidin-3-ol .	198
7.5.6	(±)- <i>cis</i> -(2 <i>RS</i> ,3 <i>RS</i>)-1-Allyl-(2-hydroxy-methyl)piperidin-3-ol	199
7.6	Synthese der <i>N</i> -allylierten racemischen Acetylcholinmimetika.....	201
7.6.1	(±)- <i>trans</i> -(1 <i>RS</i> ,3 <i>RS</i> ,6 <i>SR</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza- 7-allyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	201
7.6.2	(±)- <i>trans</i> -(1 <i>RS</i> ,3 <i>SR</i> ,6 <i>SR</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza- 7-allyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	203
7.6.3	(±)- <i>cis</i> -(1 <i>RS</i> ,3 <i>RS</i> ,6 <i>RS</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza- 7-allyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	204
7.6.4	(±)- <i>cis</i> -(1 <i>RS</i> ,3 <i>SR</i> ,6 <i>RS</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza- 7-allyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	206
7.7	Synthese der optisch aktiven carbocyclischen Organophosphate.....	208
7.7.1	(-)- <i>trans</i> -(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3- phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	208

7.7.2	(-)- <i>trans</i> -(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	210
7.7.3	(+)- <i>trans</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	211
7.7.4	(+)- <i>trans</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid.....	212
7.7.5	(+)- <i>cis</i> -(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid	212
7.7.6	(-)- <i>cis</i> -(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid	214
7.7.7	(-)- <i>cis</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid	215
7.7.8	(+)- <i>cis</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid	216
7.8	Carbocyclische Modellverbindungen.....	217
7.8.1	<i>trans</i> -(1' <i>RS</i> ,3' <i>RS</i> ,6' <i>SR</i>)- <i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-O-(3'-oxo-2',4'-dioxa-3'-phospha(1',5',5'- ² H ₃)bicyclo[4.4.0]dec- 3'-yl)-L-serin Methylester.....	217
7.8.2	<i>trans</i> -(1' <i>RS</i> ,3' <i>SR</i> ,6' <i>SR</i>)- <i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-O-(3'-oxo-2',4'-dioxa-3'-phospha(1',5',5'- ² H ₃)bicyclo[4.4.0]dec- 3'-yl)-L-serin Methylester.....	219
7.8.3	<i>cis</i> -(1' <i>RS</i> ,3' <i>RS</i> ,6' <i>RS</i>)- <i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-O-(3'-oxo-2',4'-dioxa-3'-phospha(1',5',5'- ² H ₃)bicyclo[4.4.0]dec- 3'-yl)-L-serin Methylester.....	220
7.8.4	<i>cis</i> -(1' <i>RS</i> ,3' <i>SR</i> ,6' <i>RS</i>)- <i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-O-(3'-oxo-2',4'-dioxa-3'-phospha(1',5',5'- ² H ₃)bicyclo[4.4.0]dec- 3'-yl)-L-serin Methylester.....	222

7.8.5	<i>trans</i> -(1' <i>RS</i> ,3' <i>RS</i> ,6' <i>SR</i>)- <i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-O-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phosphabicyclo[4.4.0]dec- 3'-yl)-L-serin Methylester.....	223
7.8.6	<i>trans</i> -(1' <i>RS</i> ,3' <i>SR</i> ,6' <i>SR</i>)- <i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-O-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phosphabicyclo[4.4.0]dec- 3'-yl)-L-serin Methylester.....	224
7.8.7	<i>cis</i> -(1' <i>RS</i> ,3' <i>RS</i> ,6' <i>RS</i>)- <i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-O-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phosphabicyclo[4.4.0]dec- 3'-yl)-L-serin Methylester.....	225
7.8.8	<i>cis</i> -(1' <i>RS</i> ,3' <i>SR</i> ,6' <i>RS</i>)- <i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)-O-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phosphabicyclo[4.4.0]dec- 3'-yl)-L-serin Methylester.....	227
8.	ENZYMKINETIK.....	228
8.1	Enzymkinetik- <i>assay</i>	228
8.2	Stabilitätstests mittels ^{31}P -NMR Spektroskopie von (+)-8eq.....	230
9.	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-SPEKTROSKOPIE AN INHIBIERTER AChE.....	231
9.1	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren der Modellverbindungen.....	231
9.2	Probenvorbereitung für die $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektroskopie an phosphorylierter AChE.....	231
10.	APPENDIX.....	235
10.1	Apparatur für die POFCl_2 Synthese.....	235
10.2	Kristallographische Daten der <i>N</i> -benzylierten Verbindungen.....	236
10.2.1	Daten der <i>N</i> -benzylierten Dirole.....	236
10.2.2	Daten der <i>N</i> -benzylierten ACh-Mimetika.....	239
10.3	Kristallographische Daten der carbocyclischen Organophosphate	242

11.	LITERATURVERZEICHNIS.....	246
12.	DANK.....	254
13.	LEBENSLAUF.....	256

**Wenn du in Eile bist,
gehe langsam!**

Chinesisches Sprichwort,
welches uns mahnt, im hektischen Alltag
auch einmal inne zu halten
und uns in Gelassenheit zu üben.

1. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden acht enantiomerenreine *N*-benzylierte (**Schema 18**, S. 72) und vier racemische *N*-allylierte (**Schema 25**, S. 80) Acetylcholinmimetika aus den entsprechenden Diolen hergestellt. Mittels HPLC an optisch aktiver Phase wurden die Racemate der *N*-benzylierten Vorläufer der Acetylcholinmimetika zu den optisch aktiven Verbindungen gespalten. Es wurden jeweils *ee* > 99 % erhalten.

Die absoluten Konfigurationen der optisch aktiven Diole wurden mittels der Methode nach MOSHER, durch Derivatisierung mit (*R*)- bzw. (*S*)-MTPA-Cl, bestimmt. Die Resultate konnten *via* Röntgenstrukturanalyse der Organophosphate, mit Phosphor als Schweratom, bestätigt werden. Zudem wurden acht enantiomerenreine carbocyclische Organophosphate aus [1] für diverse Untersuchungen verwendet. Als Abgangsgruppe wurde bei allen Verbindungen ausschliesslich das Fluoratom verwendet.

Die Verbindungen wurden durch enzymkinetische Messungen, welche mit einer überarbeiteten diagnostischen Methode ausgewertet wurden, untersucht und die Inhibitionsmechanismen bestimmt. Man konnte eindeutige Unterschiede in der stereochemischen Erkennung der Inhibitoren durch das Enzym feststellen.

Die in den Decalingerüsten (*cis*- und *trans*-Decaline) fixierten Organophosphate (**Abbildung 4**, **Schema 5** und **6**) wurden umfangreichen Konformationsanalysen (NMR-spektroskopisch) unterzogen. Dabei stellten sich vor allem die F-equatorial substituierten Organophosphate als sehr interessant heraus. Für das carbocyclische *cis*-equatoriale Fluoridat konnte erstmals bewiesen werden, dass das energetische globale Minimum in Lösung einem doppelt umgeklappten Doppelsessel (**Sessel-2**) entspricht.

Schlussendlich wurden, mit einigen vielversprechenden Inhibitoren, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR spektroskopische Untersuchungen an vollständig inhibierter Acetylcholinesterase durchgeführt und der stereochemische Verlauf der Inhibition durch Vergleich mit synthetischen Modellverbindungen geklärt.

2. SUMMARY

In this work eight enantiomerically pure *N*-benzylated (**Schema 18**, p. 72) and four racemic *N*-allylated (**Schema 25**, p. 80) acetylcholine mimetics were synthesized from the corresponding diols. Using HPLC on optically active phase the racemates of the *N*-benzylated precursors of the actylcholine mimetics were separated into the optically active compounds. For all compounds *ee* > 99 % was obtained.

The determination of the absolute configuration of the diols was performed with the MOSHER method through derivatization with (*R*)- and (*S*)-MTPA-Cl, resp. The results could be verified by X-ray crystallographic analysis of the organophosphates with phosphorus as heavy atom. Furthermore, eight carbocyclic and enantiomerically pure organophosphates were used for several investigations. In all compounds fluorine was the leaving group.

The compounds were tested by enzyme kinetic experiments, and the inhibition mechanisms were determined. The analyses of the kinetic experiments were performed by a revised diagnostic method. Significant differences in the stereochemical recognition of the inhibitors by the enzyme were discovered.

Extensive conformational analyses (by means of NMR-spectroscopy) of the organophosphates, fixed in the decalin system (*cis*- and *trans*-decalins), were performed (**Abbildung 4**, **Schema 5** and **6**). The F-equatorially substituted organophosphates were the most interesting compound during these investigations. For the carbocyclic *cis*-equatorial fluoridate it could be demonstrated for the first time that the energetic global minimum in solution corresponds to a doubly inverted double chair (**Sessel-2**).

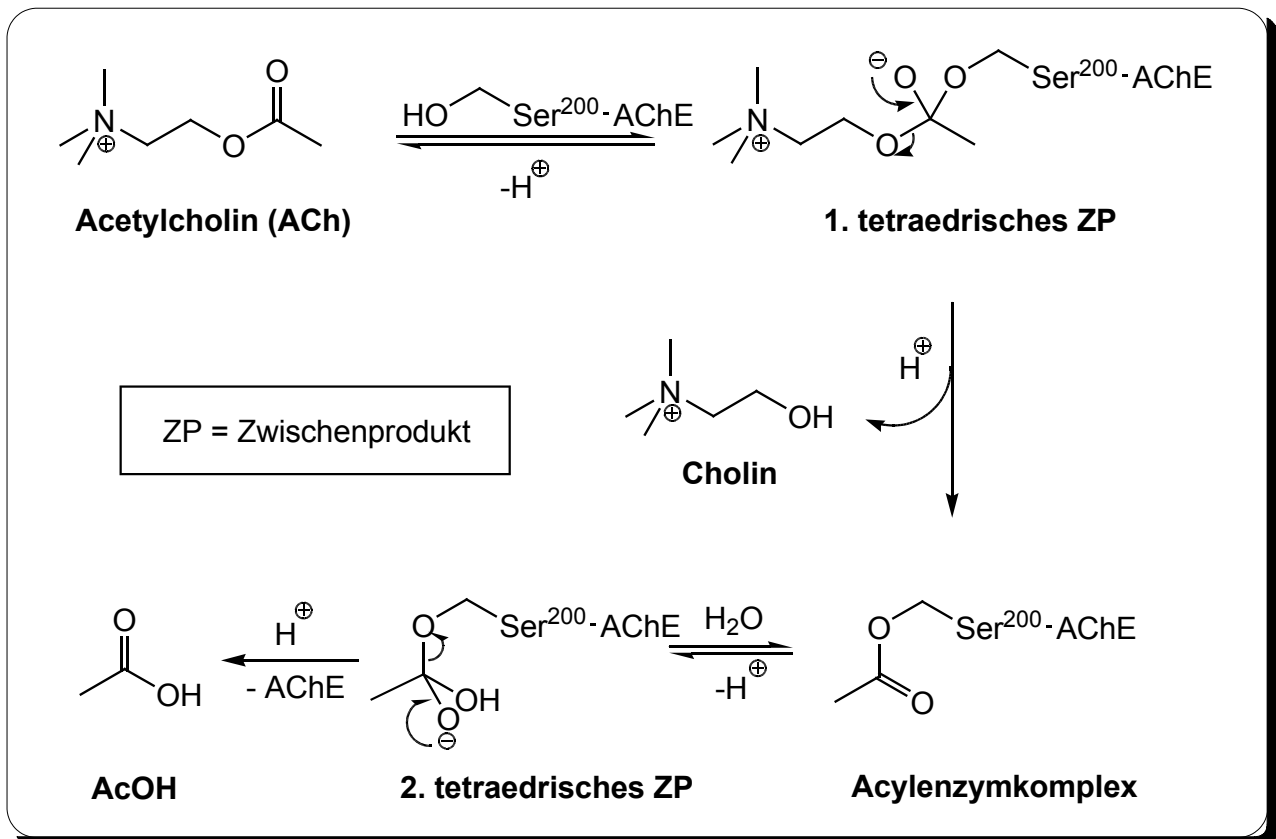
Finally, ³¹P{¹H}-NMR investigations were performed with several promising inhibitors on fully inhibited Acetylcholinesterase to elucidate the stereochemical course of the inhibition reaction by comparison with synthesized model compounds.

THEORETISCHER TEIL

3. EINLEITUNG

In diesem Abschnitt werden in knapper Form die wichtigsten Grundlagen erläutert, die zum besseren Verständnis der Arbeit notwendig sind. Einige Passagen und Abbildungen wurden aus der Dissertation von FUREGATI [2] und aus meiner Diplomarbeit [1] übernommen.

3.1 Die Acetylcholinesterase



Schema 1: AChE-katalysierte Hydrolyse von ACh.

Die Hauptfunktion der Acetylcholinesterase (AChE) besteht in der Beendigung der Impulsübertragung an cholinergen Synapsen. Im aktiven Zentrum (*active site gorge*)

des Enzyms wird dazu die Hydrolyse von Acetylcholin (ACh), dem Hauptneurotransmitter des parasympathischen Nervensystems, in Cholin und Essigsäure katalysiert [3] (**Schema 1**, vgl. auch **Schema 3**, S. 12). Diese Hydrolyse ist unentbehrlich für das Funktionieren des menschlichen Organismus.

Die Acetylcholinesterase zählt zu der Gruppe der Serinhydrolasen und ist mit einer Wechselzahl nahe an der durch die Diffusionsgeschwindigkeit vorgegebenen Obergrenze ein fast perfekter Katalysator (Wechselzahl = $25'000\text{ s}^{-1}$, bzw. Hydrolysezeit = $40\text{ }\mu\text{s}$ pro Substratmolekül) [4]. Durch die Funktion der AChE wird die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Prozesse wie Atmung und Herztätigkeit gewährleistet.

Neben der klassischen Funktion der AChE scheint dieses Enzym an einer Reihe von Prozessen beteiligt zu sein, welche mit der hydrolytischen Aktivität nichts zu tun haben. Meistens spielen bei diesen Prozessen periphere Stellen des Enzyms eine Rolle, während das katalytisch aktive Zentrum eine untergeordnete Rolle spielt. In [5] werden u.a. Neuritogenese (Neurit = Axon), Zelladhäsion, Synaptogenese und Aktivierung von Dopaminneuronen diskutiert.

3.2 Acetylcholinesterase-Inhibitoren

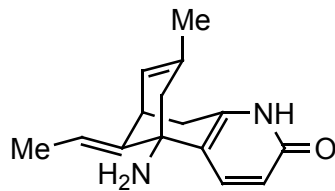
3.2.1 Reversible Acetylcholinesterase-Inhibitoren

In der Medizin werden reversible (z.T. auch irreversible) AChE-Inhibitoren zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt, die mit einer mangelhaften ACh-Ausschüttung zusammenhängen. Ein Beispiel ist die ALZHEIMER'sche Krankheit [6]. Das Alkaloid Huperzin A (**Abbildung 1**) ist ein vielversprechender Wirkstoff. Dieser Stoff wurde aus einer seit Jahrtausenden bekannten chinesischen Medizinalpflanze isoliert [7][8].

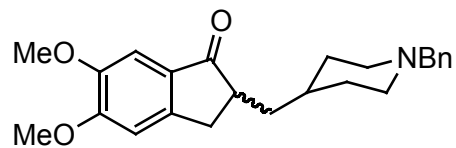
Bei der reversiblen Inhibition bildet sich ein Enzym-Inhibitor-Komplex mit spezifischen Wechselwirkungen. Eine kovalente Bindung wird jedoch nicht

ausgebildet. Man versucht durch die Optimierung der reversiblen Wechselwirkungen bereits auf dem Markt erhältliche ALZHEIMER-Medikamente wie z.B. Aricept™ weiter zu verbessern [9].

In der Medizin eingesetzte, reversible AChE-Inhibitoren:

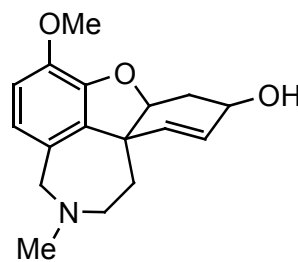


Huperzin A



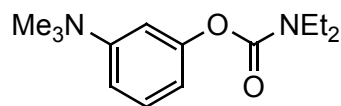
Aricept™

Alkaloid aus *Galantus nivalis*:

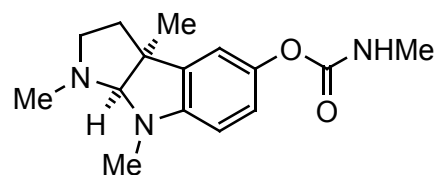


(-)-Galanthamin

In der Medizin eingesetzte, irreversible AChE-Inhibitoren:



Neostigmin



Physostigmin

Abbildung 1: Nicht phosphorhaltige AChE-Inhibitoren.

3.2.2 Irreversible Acetylcholinesterase-Inhibitoren

Die Acetylcholinesterase kann leicht durch Organophosphorverbindungen, Carbamate, Borsäureester oder Sulfonylhalogenide irreversibel inhibiert werden. In der **Tabelle 1** ist eine Auswahl von Organophosphorverbindungen gezeigt. Darunter befindet sich das achirale Diisopropylfluorophosphat (DFP) und das Organophosphonat Soman (ein Nervengift) mit zwei Chiralitätszentren.

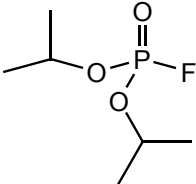
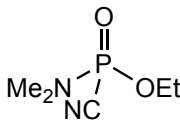
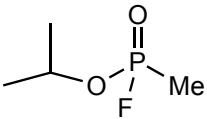
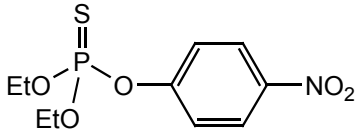
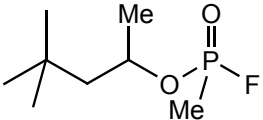
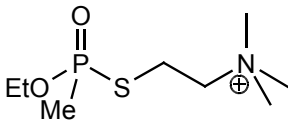
DFP		Laborchemikalie, Sonde für alle Serinhydrolasen: LD ₅₀ = 5 mg/kg.
Tabun		Nervengift: LD ₅₀ = 0.6 mg/kg.
Sarin		Nervengift: LD ₅₀ = 0.2 mg/kg.
Parathion		Insektizid, metabolisiert zur Oxoverbindung: LD ₅₀ = 10 mg/kg.
Soman		Nervengift: LD ₅₀ = 0.13 mg/kg.
LXI		Acetylcholin-Mimetikum: LD ₅₀ = 0.03 mg/kg.

Tabelle 1: Organophosphorverbindungen als irreversible AChE-Inhibitoren; LD₅₀ für Mäuse (subcutan) [10], (intraperitoneal) [11][12].

Die akute Toxizität der Verbindungen liegt in der Fähigkeit, ein kovalent gebundenes Enzym-Inhibitor-Addukt zu bilden [3][13], was eine Akkumulation von ACh (Acetylcholin) im synaptischen Spalt bewirkt. In der Folge wirkt der eigene Neurotransmitter toxisch durch zu langes Binden an den als Na⁺- und K⁺-Kanal fungierenden ACh-Rezeptor. Der gebundene Ligand bewirkt durch Öffnung des Kanals die Depolarisierung der postsynaptischen Membran und ein weiteres Aktionspotential. Die Symptome der resultierenden Übererregung des parasympathischen Nervensystems, als Folge des ACh-Staus, sind unter anderem eine Verengung der Pupillen, übermässiger Speichelfluss, Verlangsamung der Herzaktivität, Krämpfe und schliesslich der Tod durch Atemstillstand.

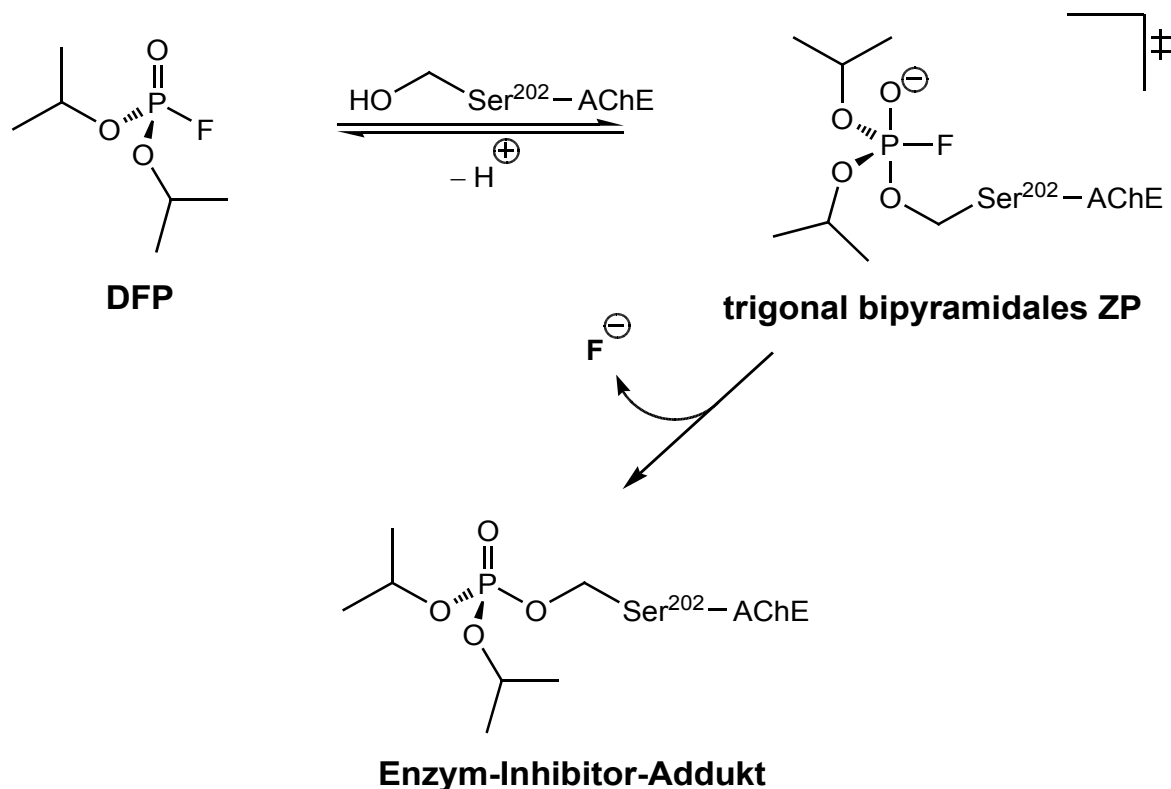
In der **Tabelle 1** ist auch LXI, einer der toxischsten irreversiblen Inhibitoren, aufgeführt. LXI weist eine signifikante Ähnlichkeit mit dem Acetylcholin bzw. Acetylthiocholin auf. Ersetzt man in LXI die Trimethylammoniumgruppe mit einer Diisopropylaminogruppe (unter physiologischen Bedingungen protoniert) so erhält man VX als ein weiteres enorm toxisches acetylcholinmimetisches Nervengift [10].

Myasthenia gravis (Muskelschwund) und *Glaucoma* (grüner Star) [14] sind Krankheiten, die mit Carbamaten als irreversible AChE-Inhibitoren behandelt werden: z.B. mit Neostigmin oder Physostigmin (**Abbildung 1**).

3.2.3 Mechanismus der irreversiblen Inhibition der Acetylcholinesterase mit Organophosphorverbindungen

Organophosphate und Organophosphonate bilden ganz spezifisch eine kovalente Bindung zu einem einzigen, aktivierten Serinrest im katalytischen Zentrum der AChE¹. MERCKLING konnte ein dem trigonal-bipyramidalen Zwischenprodukt (ZP) (**Schema 2**) analoges, pentakoordiniertes Intermediat isolieren [15].

¹ Die anderen irreversiblen AChE-Inhibitoren binden ebenfalls ausschliesslich an den gleichen Serinrest, bei TcAChE (aus *Torpedo californica*): Ser²⁰⁰, bei EeAChE (aus *Electrophorus electricus*): Ser²⁰².



Schema 2: Postulierter Mechanismus der Inhibition von AChE mit DFP. Trigonal bipyramidales Zwischenprodukt [15], Enzym-Inhibitor-Addukt [16].

Die tetraedrischen Enzym-Inhibitor-Addukte (**Schema 2**) gelten als gute Analoga des ersten tetraedrischen Zwischenproduktes (**Schema 1**, S. 3) bei der Hydrolyse von ACh. Letzteres wird sehr schnell zu Cholin und Acetat hydrolysiert ($t_{1/2} = 1 \text{ ms}$). Die spontane Reaktivierung der phosphorylierten² AChE hingegen verläuft sehr langsam ($t_{1/2} = 108 \text{ d}$), so dass man von einer chemisch zwar reversiblen, biologisch aber irreversiblen Hemmung der AChE sprechen kann. Die Elimination des Giftes aus dem Körper ist quantitativ bedeutungslos. Chronische Exposition hat daher eine Kumulation der Organophosphate im Organismus durch kovalente Bindung an die AChE zur Folge [11][12].

Durch die verhältnismässig hohe Stabilität des Enzym-Inhibitor-Adduktes (**Schema 2**) ist die phosphorylierte AChE durch Untersuchungen mit ^{31}P -NMR-Spektroskopie

² Der in der Literatur übliche Begriff "phosphoryliert" fasst die Bezeichnungen "phosphoryliert" und "phosphonyliert" zusammen, bezeichnet also die Ester der Phosphorsäure bzw. der Phosphonsäure.

[16] und in gewissen Fällen durch Röntgenstrukturanalyse [17] prinzipiell zugänglich. Dadurch werden mechanistische Studien an der AChE möglich, welche aus medizinischer und toxikologischer Sicht von grosser Wichtigkeit sind.

3.2.4 Atropin als Antidot

Die Wirkung der die AChE blockierenden Nervengifte lässt sich im menschlichen Organismus auf verschiedenen Wegen verringern.

Eine Möglichkeit ist die Besetzung der muskarinartigen Rezeptoren für Acetylcholin an der postsynaptischen Membran des Erfolgsorgans mit Hilfe kompetitiv hemmender Parasympatholytika. Hierzu eignet sich besonders das Atropin. Es hat nur eine anticholinerge Wirkung und reagiert nicht mit dem Nervenkampfstoff selbst. Besondere Bedeutung kommt der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Atropin zu, wodurch neben dem Schutzeffekt im peripheren Nervensystem auch ein Schutz lebenswichtiger Zentren des Gehirns (Atmungs- und Kreislaufzentren) zustande kommt. Atropin muss jedoch vor dem Kontakt mit dem Nervengift eingenommen werden und verhindert nur den Angriff des Nervengiftes auf die AChE. Atropin kann nicht zur Entgiftung eingesetzt werden. Es wurde lange Zeit mit Oximen, als mögliche Antidoten zur Reaktivierung der phosphorylierten AChE, experimentiert, aber wirklich verlässliche praktische Methoden zur Entgiftung nach einem Kontakt mit Organophosphorverbindungen wurden noch nicht gefunden [11][12].

Ein weiteres Problem bei der Vergiftung mit Organophosphorverbindungen ist, dass die Enzym-Inhibitor-Addukte "altern". Unter "Altern" versteht man die Bildung eines Enzym-Inhibitor-Adduktes, welches nicht mehr regeneriert werden kann. Die AChE ist in diesem Fall irreversibel zerstört. Das Enzym-Inhibitor-Addukt des Kampfstoffes Soman mit der AChE "altert" nämlich schon innerhalb weniger Minuten (Somaneffekt), während derselbe Vorgang mit den Kampfstoffen Tabun, Sarin und VX Stunden benötigt [11][12].

3.3 Weiteres zur Acetylcholinesterase

3.3.1 Struktur der Acetylcholinesterase aus *Torpedo californica*

Die Veröffentlichung der Kristallstruktur der AChE aus dem Zitterrochen *Torpedo californica* (TcAChE) von der Arbeitsgruppe von SILMAN und SUSSMAN [18] war ein Meilenstein in der Erforschung der AChE. Das glycolipidverankerte Homodimer des 537 Aminosäurenreste enthaltenden Enzyms konnte mittels einer bakteriellen phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C selektiv aus dem Gewebe des elektrischen Organs von *Torpedo californica* herausgelöst und kristallisiert werden.

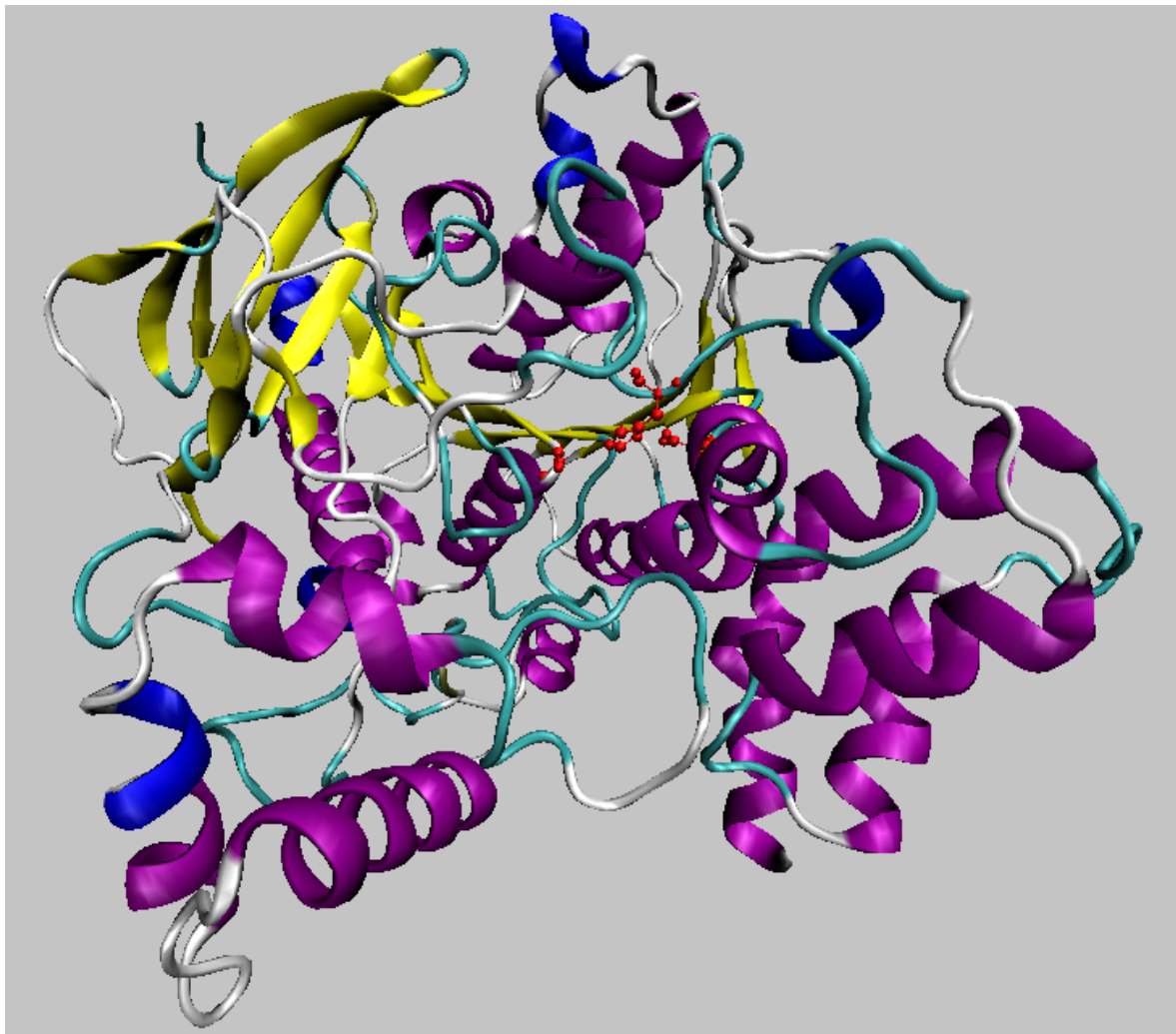


Abbildung 2: Blick auf die active site gorge (rot) von TcAChE (PDB 1E3Q).

3.3.2 Die *active site gorge*

Das besondere und absolut unerwartete Merkmal der AChE ist die enge, *ca.* 20 Å tiefe *active site gorge*, ein "Tunnel", der von der Oberfläche ins Zentrum des Enzyms zur katalytischen aktiven Stelle (*active site*) führt und sich gegen unten etwas verbreitert. An der engsten Stelle ist die *gorge* nur gerade 5 Å breit. Dieser sogenannte Flaschenhals wird von **Tyr121** und **Phe330** gebildet. Die quaternäre Ammoniumgruppe hat aber einen Durchmesser von 6.4 Å. Die *gorge* muss in diesem Bereich daher relativ flexibel sein, damit sie das Acetylcholin zur *active site* durchschleusen kann [18].

Die *gorge* ist etwa zu 40 % bzw. mit 14 sehr stark konservierten, aromatischen Aminosäuren ausgekleidet. Vermutlich leiten diese das Substrat mit Kation- π -Wechselwirkungen durch den Tunnel zum katalytisch aktiven Zentrum [18]. Nur so lassen sich die hohe Geschwindigkeit der Katalyse und der enge Tunnel, der vom Substrat passiert werden muss, zumindest ansatzweise verstehen.

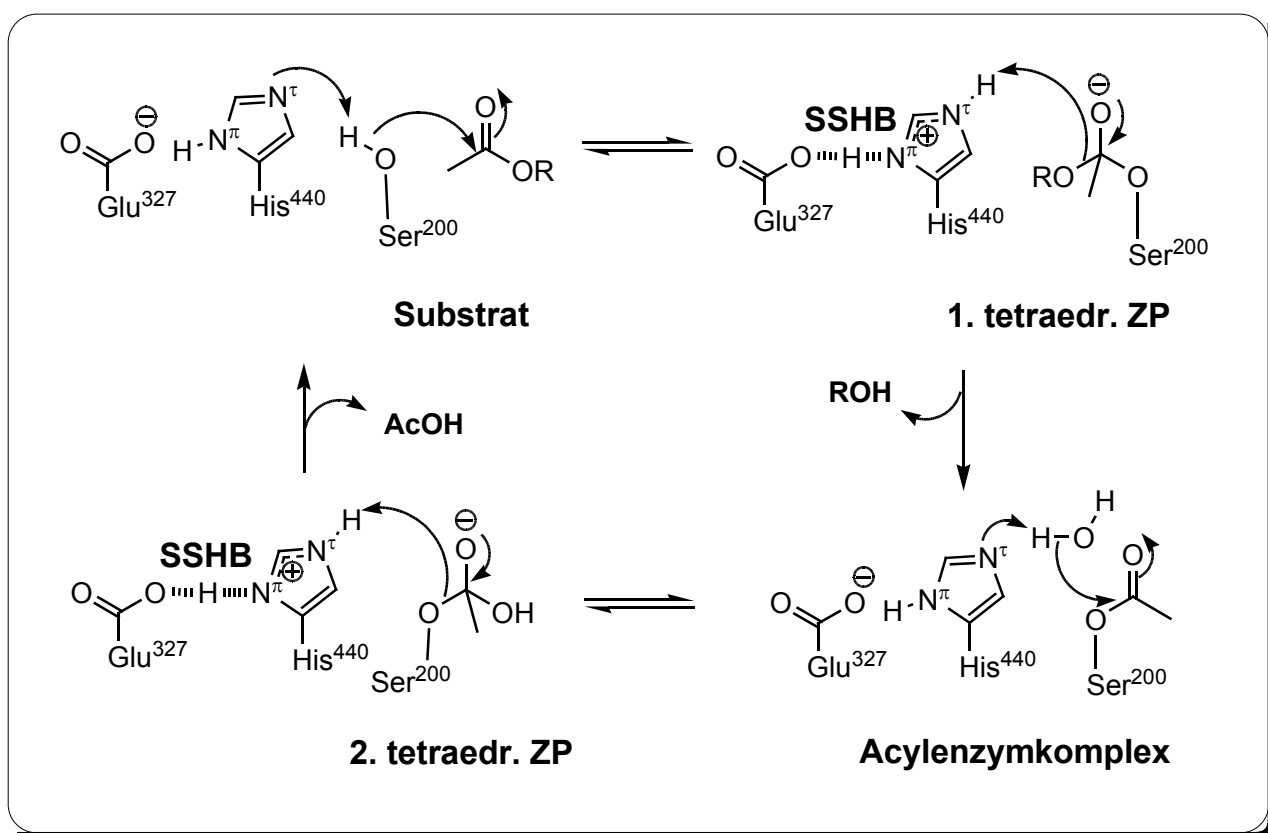
3.3.3 Die katalytische Triade

Die AChE ist eine Serinhydrolase und besitzt eine katalytische Triade wie das wohlbekannte Enzym Chymotrypsin. Bei der Aufklärung dieser Hypothese wurde zum ersten Mal in einer Serinhydrolase Glutamat an der Stelle von Aspartat (Chymotrypsin) gefunden. Auch die Anordnung der katalytischen Triade in Bezug auf das Protein-Rückgrat ist bei der AChE eher ungewöhnlich [18].

Die Funktionsweise der katalytischen Triade ist in **Schema 3** gemäss [19] dargestellt. Dabei wird eine SSHB (*short strong hydrogen bond*) zwischen dem Carboxylat und dem H-Atom am N $^{\pi}$ -Atom des Histidinrestes gebildet. Dies wurde durch ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt. Nur das Proton der Serinhydroxygruppe wird vollständig auf N $^{\epsilon}$ des Histidinrestes übertragen. Diese Theorie löst die Vorstellung eines *charge relay systems* [20] ab, wonach zwei vollständige

Ladungstransfers stattfinden. Der Acylenzymkomplex wird nun von einem Wassermolekül angegriffen. Dabei entsteht ein zweites tetraedrisches Zwischenprodukt unter Ausbildung einer SSHB. Abschliessend wird Essigsäure freigesetzt und das Enzym regeneriert. Es kann nun ein neuer Katalysezyklus beginnen.

Die Existenz eines dem ersten tetraedrischen Zwischenprodukt in *Schema 3* entsprechenden AChE-Komplexes mit TMTFA³ wurde in [21] mittels ¹⁹F-NMR-Spektroskopie und durch Röntgenstrukturanalyse [22] bewiesen.



Schema 3: Die katalytische Triade von TcAChE. Die zentrale Aufgabe der Triade ist die Aktivierung der Nucleophilie des Serins.

³ *m*-(*N,N,N*-Trimethylammonio)-2,2,2-trifluoroacetophenon (TMTFA) ist ein mechanismusbasierter AChE-Inhibitor. Er bildet zwar eine kovalente Bindung zum Enzym aus, ist aber reversibel, da er keine Abgangsgruppe besitzt.

3.3.4 Die "anionischen" Bindungsstellen

Es gibt zwei "anionische" Bindungsstellen in Enzym. Zum einen die CAS (*cationic anionic site*), welche Enzym-Substrat-Komplex *via* Kation- π -Interaktion mit **Trp84** und **Phe330** (und auch **Glu199**) stabilisiert [18]. **Trp84** nimmt eine relativ starre Position ein, welche auch durch die Anwesenheit von verschiedenen Inhibitoren kaum beeinflusst wird, während die Seitenkette **Phe330** hingegen sehr beweglich ist, was auch unbedingt notwendig ist, da das **Phe330** auch Teil des Flaschenhalses ist (siehe **Kapitel 3.3.2**). Die andere anionische Bindungsstelle ist die PAS (*peripheric anionic site*). Diese Bindungsstelle ist wie auch die CAS keine "anionische", sondern eine auf Kation- π -Interaktion basierende Stelle, welche sich an der Öffnung der *active site gorge* befindet. Sie enthält die drei wichtigen Aminosäuren **Trp279**, **Tyr70** und **Asp72** [23][24]⁴. Es wird vermutet, dass die PAS bei der Substratinhibition eine Rolle spielt, und zwar mit einem Mechanismus, bei dem die Bindung von ACh in der PAS die Ausschaffung des Cholins aus der *active site* behindert [25]⁴. STOJAN et al. [26] präsentieren in ihrer Arbeit gleich noch einen raffinierteren Mechanismus, bei dem die Bindung von zwei Molekülen ACh in der *gorge* des acylierten Enzyms den Zugang von Wasser verunmöglichen, womit das Enzym nicht deacyliert werden kann. In [27] wird aufgrund von Röntgenstrukturanalysen angedeutet, dass bei moderater Substratkonzentration die Inhibition durch die Bindung von einem Substratmolekül in der PAS ausgelöst wird. Wie oben beschrieben, wird vermutet, dass durch diese Bindung die Cholinausschaffung behindert ist. Bei hoher Substratkonzentration binden allerdings zwei ACh Moleküle in der *active site gorge*, was die Inhibition durch Verhinderung der Acetatausschaffung verursacht.

4 Liste der Referenzen ist nicht vollständig.

3.3.5 Das Oxyanion-Loch

Das Oxyanion des 1. tetraedrischen Zwischenproduktes (**Schema 1**, S. 3) wird durch die Amidstickstoffe der Aminosäuren **Gly118**, **Gly119** und **Ala201**, welche das sogenannte Oxyanion-Loch bilden, stabilisiert. Die gleiche Stabilisierung erfährt die Oxogruppe des Enzym-Inhibitor-Addukts (**Schema 2**, S. 8) der phosphorylierten AChE. Die asymmetrische Anordnung des Oxyanion-Lochs erklärt die ausgezeichnete Stereoselektivität der AChE gegenüber Soman (**Tabelle 1**, S. 6). Die S_P -Diastereoisomere binden rund 10'000 mal schneller an das Enzym als die R_P -Diastereoisomere [28]. Die Acyltasche wird durch die Aminosäuren **Phe288** und **Phe290** dargestellt. Sie verhindert das Eintreten von grösseren Resten als die Acetylgruppe. Sie ist für die Substratspezifität verantwortlich.

3.4 Acetylcholinesterase aus *Electrophorus electricus*



Abbildung 3: *Electrophorus electricus* aus dem Zürcher Zoo.

In der vorliegenden Arbeit wurde das käufliche Enzym aus dem Zitteraal *Electrophorus electricus* (EeAChE) verwendet, da das elektrische Organ dieses Tieres eine besonders reichhaltige Quelle für AChE ist. Das elektrische Organ besteht aus modifizierten Muskelzellen. Es entladen sich gleichzeitig jeweils *ca.* 6000 in Serie geschaltete Elektrozyten. Nach jedem Elektroimpuls baut die AChE den Neurotransmitter im synaptischen Spalt zwischen Nerven- und Elektrozyten wieder ab.

Der Zitteraal ist wie folgt klassifiziert. Ordnung: *Gymnotiformes*; Familie: *Electrophoridae*; Spezies: *Electrophorus electricus*; Englischer Name: *Electric Eel*; Deutscher Name: *Zitteraal*. Der Zitteraal kommt im Orinoco und den Flüssen des Amazonas-Beckens vor und ernährt sich von anderen Fischen, die er mit Stromschlägen mit einer Spannung von bis zu 600 V tötet. Der Zitteraal ist gut an undurchsichtige Gewässer angepasst. Er benutzt die Elektrorezeption [29] zur Orientierung. Der Sehsinn spielt dabei eine untergeordnete Rolle. Das Paarungsverhalten ist auch eng mit der Elektrorezeption verknüpft. Mit deren Hilfe können Alter und Geschlecht von Artgenossen ermittelt werden. Erwachsene Tiere werden bis zu 2.5 m lang [30].

Im Jahr 1999 wurden zwei verschiedene Konformationen des Tetramers der EeAChE mit Auflösungen von 4.2 bzw. 4.5 Å publiziert [31]. Viele strukturelle Einzelheiten über die Acetylcholinesterasen sind aber aus den Kristallstrukturen der TcAChE bekannt, weil sie rund doppelt so gut aufgelöst sind wie die Strukturen der EeAChE. Nun ist es natürlich wünschenswert, dass man die Einsichten aus den Strukturen der TcAChE auch auf die EeAChE anwenden könnte. FUREGATI zeigte mittels eines Sequenzvergleichs der beiden Enzyme [2], dass ein solcher Vergleich durchaus zulässig ist.

4. DAS FORSCHUNGSPROJEKT

Im folgenden Abschnitt wird die Idee des Forschungsprojektes kurz zusammengefasst und auf die wichtigsten bisherigen Arbeiten eingegangen.

4.1 Das Forschungsprojekt

Am Anfang dieses Forschungsprojektes steht die Frage:

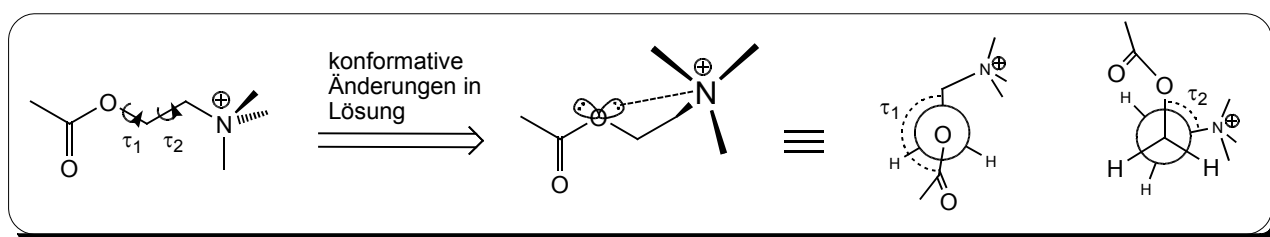
Welches ist die physiologisch aktive Konformation des Acetylcholins?

Mit dieser Frage haben sich schon unzählige wissenschaftliche Arbeiten beschäftigt. Nach mehreren Jahrzehnten Forschung scheint es nun klar, dass es nicht nur *eine* physiologisch aktive Konformation des Acetylcholins gibt. Denn während der mehrstufigen und strukturell sehr komplexen Reaktion der AChE mit ACh, sind konformative Änderungen der beteiligten Reaktanden erforderlich. Man kann also davon ausgehen, dass es mehrere relevante Konformere des ACh's entlang des gesamten Reaktionsweges gibt.

Vereinfacht betrachtet gibt es drei Hauptkonformationen während der Hydrolyse-reaktion:

Erstens: Das ACh wird aus den präsynaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Das ACh ist anschliessend für eine sehr kurze Zeit von *ca.* 1 ms [32] frei in Lösung, weshalb die relevante Konformation des ACh's hier auch als "freie" Konformation bezeichnet werden kann. Die stabilste "freie" Konformation ist die *trans*, *gauche* Konformation ($\tau_1 = 166.9^\circ$, $\tau_2 = 84.7^\circ$ [33]) , wie in **Schema 4** dargestellt. Diese Erkenntnis wurde durch diverse Röntgenstrukturanalysen [34][35], ^1H -NMR Untersuchungen [36][37] und *Molecular Modelling* (MM) Arbeiten [38] [39] untermauert⁵.

⁵ Die Aufzählung der Referenzen in diesem Abschnitt ist nicht vollständig. Die wenigen ausgewählten Literaturstellen sollen lediglich die getätigten Aussagen bestätigen.



Schema 4: Freie *trans* (τ_1), *gauche* (τ_2) Konformation des ACh's.

Zweitens: Wenn sich das Substrat im Millieu des synaptischen Spalts dem Enzym nähert, findet eine Art Erkennung statt, während der sich die Konformationen beider Reaktanden in einer Art verändern müssen, dass ein stabiler Enzym-Substrat-Komplex nach dem *induced fit* Prinzip [40] entstehen kann. Diese "Erkennungskonformation" kann aufgrund der enormen Geschwindigkeit (das Enzym arbeitet nahe an der diffusionskontrollierten Grenze) des Vorgangs und dem Mangel an adäquaten Analysemethoden leider nicht direkt bestimmt werden. Es lassen sich lediglich nach dem "Vorher/Nachher"-Prinzip Aussagen über diese Erkennungsvorgänge machen.

Drittens: Nachdem sich Substrat und Enzym erkannt haben, binden sie sich aneinander. Diese Bindung kann nicht-kovalent (elektrostatische-, van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen (WW)) oder kovalent sein. Im Falle des Acetylcholins handelt es sich bei der Bindung in der PAS um rein nicht-kovalente WW, während in der *active site* neben nicht-kovalenten WW auch kovalente WW (z.B. tetraedrisches Zwischenprodukt) eine Rolle spielen.

In einer 2006 erschienenen Arbeit [41] wurden eindruckliche und anschauliche Kristallstrukturen von ACh, gebunden in der PAS und in der *active site* von mutierter AChE (S203A), präsentiert. Diese *Snapshots* zeigen mögliche Zustände des ACh's beim Weg durch die *gorge*. Die durch die *crystal-soaking*-Technik gewonnenen Kristallstrukturen zeigen, dass das ACh in der *active site* in der *trans*, *gauche* Konformation vorliegt. Dieses Resultat stimmt mit den Erkenntnissen aus den Arbeiten [34 – 39] überein. Das ACh, welches in der PAS gebunden ist, nimmt eine *trans*, *trans* Konformation ($\tau_1 \approx 180^\circ$, $\tau_2 \approx 180^\circ$) ein. Dieses Resultat unterstreicht

nochmals die Erkenntnis, dass die physiologisch aktive Konformation des ACh's von der Situation im momentanen Reaktionsschritt abhängt. Beim Eintritt in die *gorge* ist die aktive Konformation eine andere als bei der Annäherung an die *active site*.

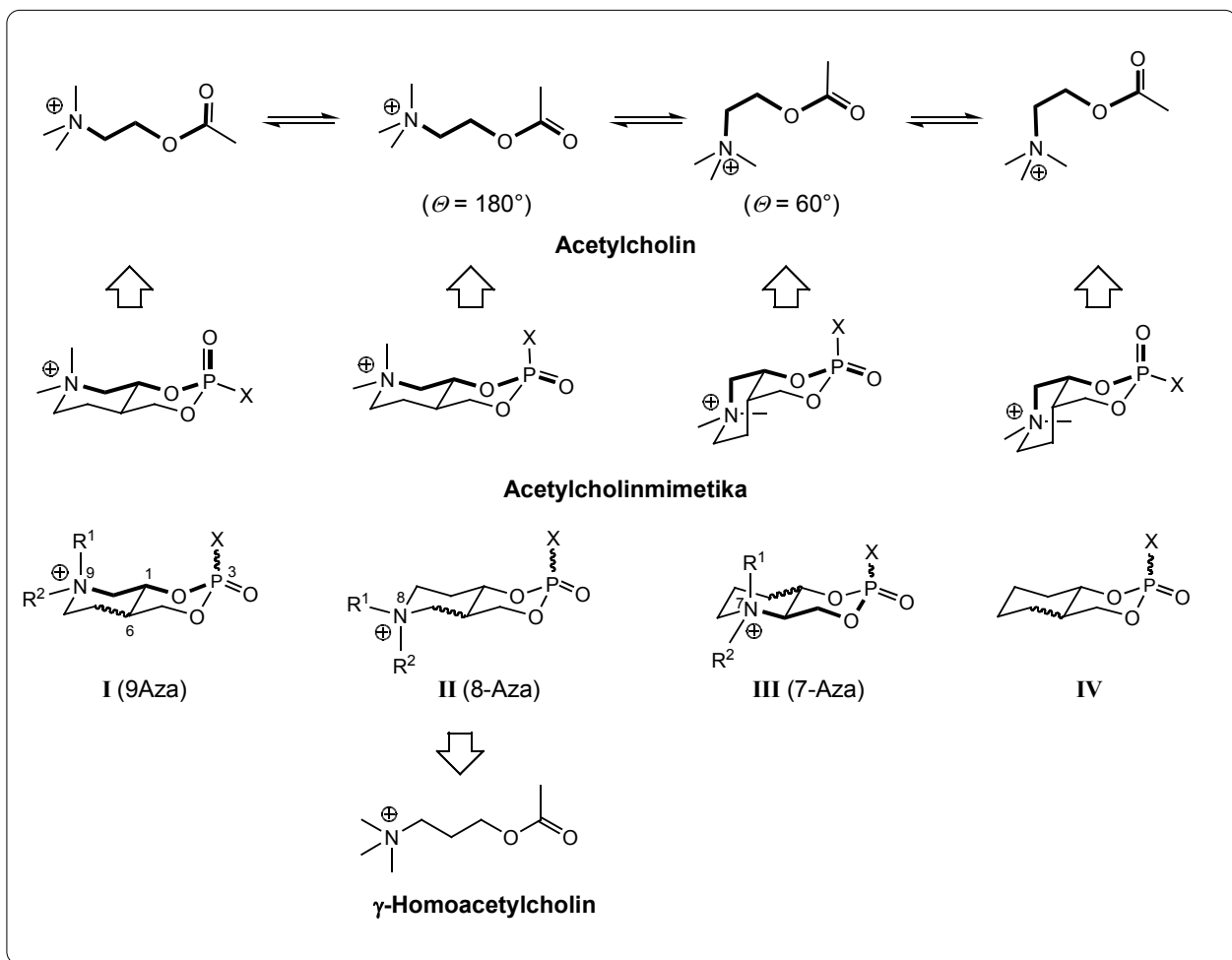
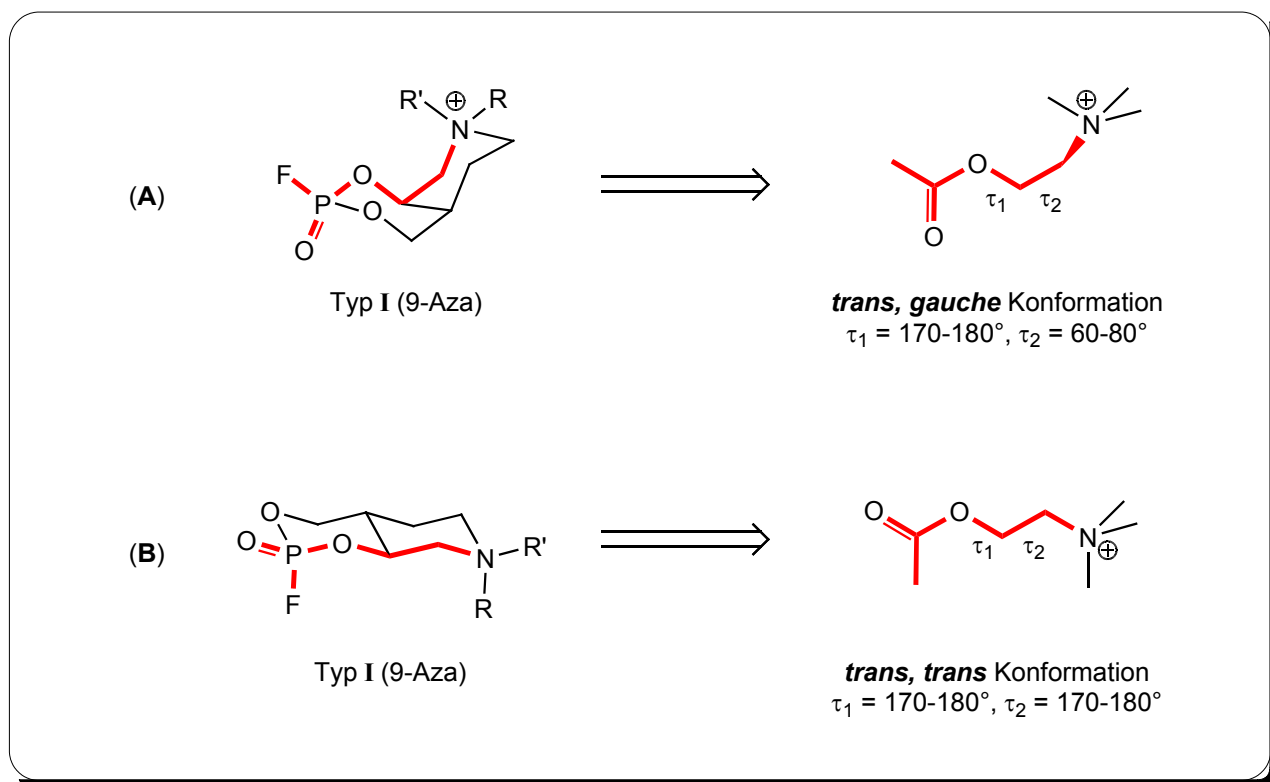


Abbildung 4: Übersicht zum Konzept des Forschungsprojektes.

Leider gibt es noch keine Methoden, mit denen man die Dynamik dieser enzymatischen Reaktionen direkt untersuchen kann. Deshalb ist man nach wie vor darauf beschränkt, Momentaufnahmen zu generieren und zu versuchen daraus auf die dynamischen Prozesse zu schließen.

In diesem Forschungsprojekt wird versucht, der Frage nach der physiologisch aktiven Konformation des ACh's mittels ^{31}P -NMR und Enzymkinetik auf den Grund zu gehen. Dazu werden die verschiedenen Konformationen des Acetylcholins durch die in **Abbildung 4** gezeigten *cis*- und *trans*-Decalinsysteme mimetisiert. Die einzelnen

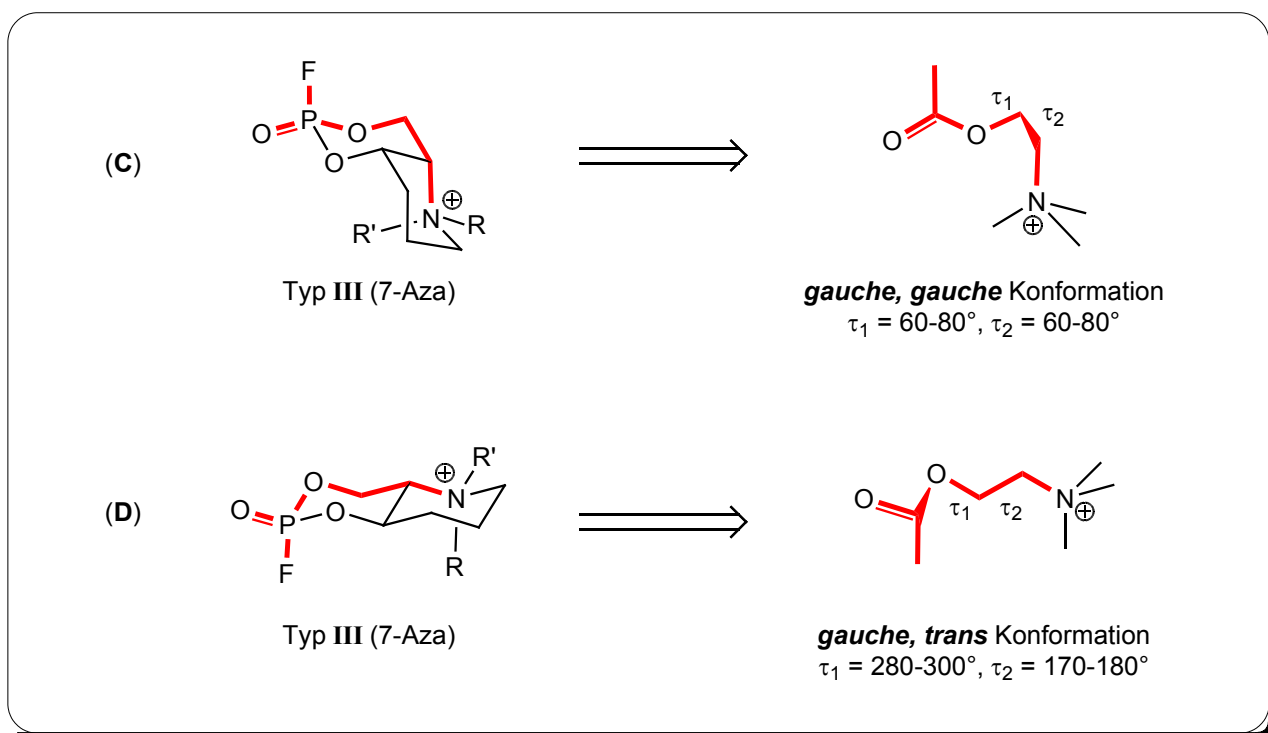
Konformationen können so regelrecht "eingefroren" werden, obwohl die Decaline auch Flexibilität besitzen, wie später in dieser Arbeit gezeigt wird.



Schema 5: (A) zeigt ein cis-Decalin des Typs **I** mit der Abgangsgruppe F in equatorialer Position. Die mimetisierte Konformation entspricht der trans, gauche-Konformation wie in [33] beschrieben. Dies ist gleichzeitig die aktive Konformation des Acetylcholins, wenn es in der active site gebunden ist [41]. (B) zeigt ein trans-Decalin des Typs **I** mit der Abgangsgruppe in axialer Position. Dies entspricht der trans, trans-Konformation des ACh, wenn es in der PAS gebunden ist [41].

Die Typen **I** und **III** stellen echte Acetylcholinmimetika dar, wobei Typ **II** das nicht natürliche *homo*-Acetylcholin mimetisiert. Der Typ **IV** stellt den einfachsten Typ dar, den sogenannten carbocyclischen⁶ AChE-Inhibitor, ohne Stickstoff im Decalingerüst. Die Verbindungen des Typs **IV** stehen ganz am Anfang des Forschungsprojektes und basieren auf Arbeiten von GORENSTEIN [42].

⁶ Wenn von **carbocyclischen** Verbindungen die Rede ist, sind damit jene Organophosphate gemeint, welche ausser Sauerstoff und Phosphor keine weiteren Heteroatome im Decalingerüst haben (Typ **IV**).



Schema 6: (C) zeigt ein cis-Decalin des Typs **III** mit der Abgangsgruppe in axialer Position. Dieses repräsentiert eine gauche, gauche-Konformation des ACh. (D) zeigt ein trans-Decalin des Typs **III**. Dieses Mimetikum entspricht einer gauche, trans-Konformation des natürlichen ACh.

Durch die Einführung des Stickstoffs in den Positionen 7, 8 und 9 soll der Cholinteil des Acetylcholins mimetisiert werden. Gleichzeitig bietet der Stickstoff, durch die Einführung verschiedener Substituenten, viele Möglichkeiten, das Molekül systematisch zu modifizieren und damit seine chemischen Eigenschaften zu "tunen". In den **Schemen 5** und **6** wird in je zwei Beispielen aufgezeigt, welche Decaline welche Konformationen des ACh's repräsentieren.

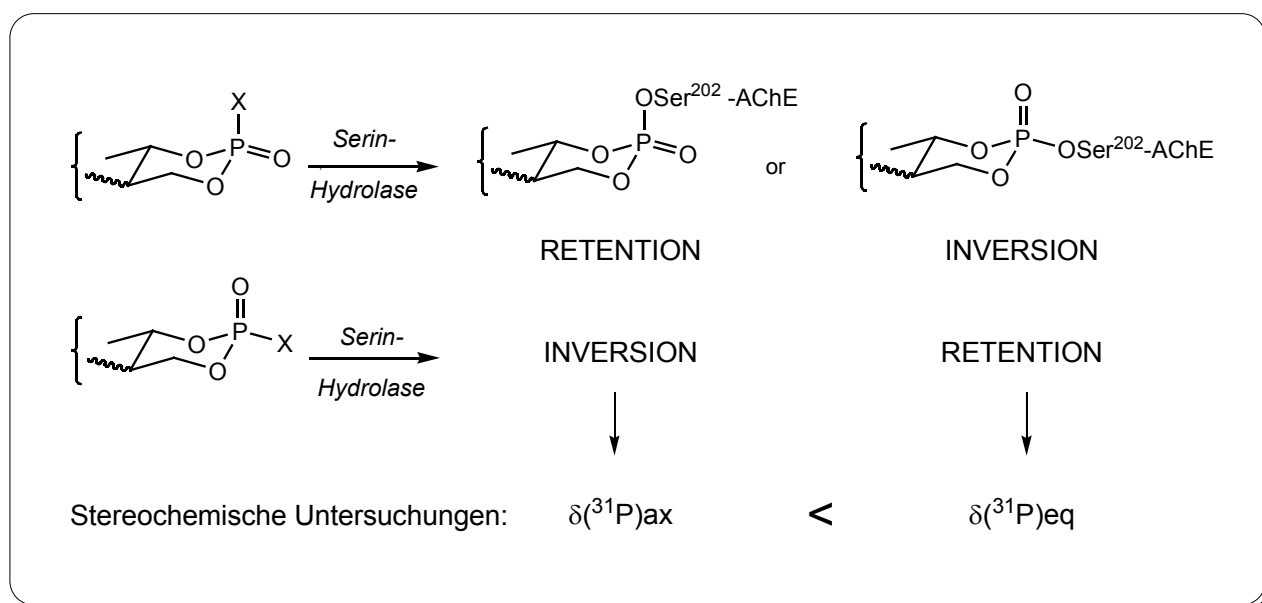
Nun stellt sich eine weitere Frage:

*Wie kann man mit den in **Abbildung 4** gezeigten Verbindungen Informationen über die Vorgänge in der active site bekommen?*

In vielen Publikationen wurde die akute Toxizität von Organophosphorverbindungen

wie Diisopropylfluorophosphat (DFP) beschrieben. Diese Toxizität ist auf ihre Fähigkeit zurückzuführen, AChE und andere Serinhydrolasen wie Chymotrypsin, durch kovalente Bindung an das active site Serin zu inhibieren [20][43 – 51]⁷. Somit stellen die Organophosphate aus **Abbildung 4** ausgezeichnete Sonden dar, die die Untersuchung der Inhibition mittels ³¹P-NMR Spektroskopie ermöglichen [52 – 55]. Die chemische Verschiebung des Phosphors ist zudem stark abhängig von den jeweiligen Substituenten (F, 2,4-Dinitrophenoxy (DNP), Serin, usw.) und den konfigurativen und konformativen Änderungen am Phosphoratom [56][57]. Das Phosphoratom stellt somit auch einen stereochemischen "Anker" dar, der Informationen über den stereochemischen Verlauf der Inhibition liefern kann. Weiter kann man die Verbindungen am Phosphor, durch Variation der Abgangsgruppe, leicht systematisch modifizieren.

Welche Erkenntnisse lassen sich aus unseren Experimenten gewinnen?



Schema 7: EeAChE = electric eel Acetylcholinesterase, X = gute Abgangsgruppe (F, 2,4-Dinitrophenoxy, usw.).

Durch die Charakterisierung der Inhibitoren mittels Enzymkinetik lassen sich

⁷ Diese Aufzählung von Referenzen erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Aussagen über die selektive Erkennung der enantiomeren Verbindungen durch das Enzym machen. Weiter kann durch die kinetische Information auch auf die physiologisch aktive Form des Acetylcholins geschlossen werden. Hier ist allerdings Vorsicht geboten, da sich die Mimetika in ihrem Volumen doch recht stark vom natürlichen Substrat unterscheiden.

Ganz allgemein lassen sich die Konfigurationen und die Konformationen der Decalinsysteme über die $^3J(\text{P,H})$ -Kopplungen und die ^{31}P -chemischen Verschiebungen bestimmen. ^{31}P -NMR Experimente an vollständig phosphosylierten Serinhydrolasen (z.B. δ -Chymotrypsin, AChE) geben Aufschluss über den stereochemischen Verlauf der Inhibitionsreaktion. Dabei wird die chemische Verschiebung des P-Atoms in den Enzym-Inhibitor-Addukten analysiert (vgl. **Schema 7**, S. 21).

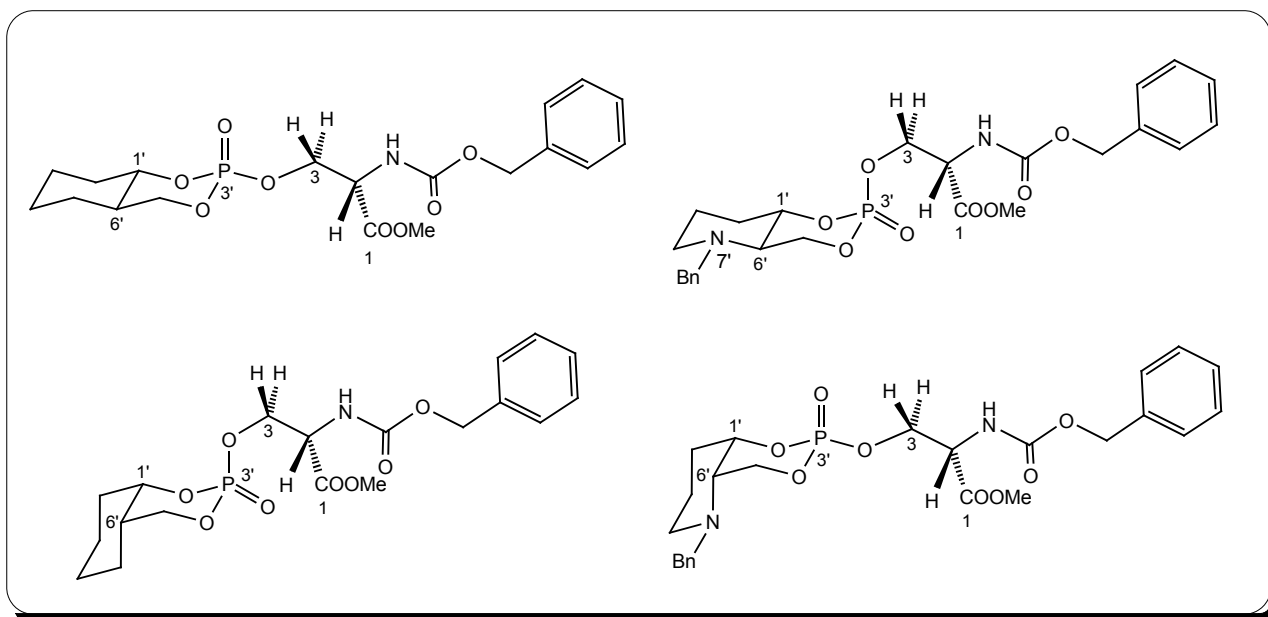


Abbildung 5: Einige Beispiele von Modellverbindungen für die Antizipierung der chemischen Verschiebung von ^{31}P in den Enzym-Inhibitor-Addukten.

Zur Zuordnung der ^{31}P -NMR-Signale in den Enzym-Inhibitor-Addukten werden diverse bicyclische Modellverbindungen (siehe **Abbildung 5**) hergestellt. Die Modellverbindungen repräsentieren den kovalent an das aktive Serin gebundenen

Inhibitor. Dabei wird das *active site* Serin durch einen Z-geschützten L-serinmethylester (ZSME) mimetisiert. So lassen sich die zu erwartenden chemischen Verschiebungen von ^{31}P in den Enzym-Inhibitor-Addukten sehr gut antizipieren.

4.2 Übersicht zu den bisherigen Arbeiten

In **Abbildung 6** werden alle Arbeiten aus der Forschungsgruppe auf dem Gebiet der carbocyclischen Verbindungen schematisch zusammengefasst. **Abbildung 7** zeigt eine Übersicht zu allen Arbeiten auf dem Gebiet der Acetylcholin- und *homo*-Acetylcholinmimetika.

MERCKLING [58] war der erste, der auf dem Gebiet der carbocyclischen Organophosphate arbeitete. Er machte erste enzymkinetische Analysen seiner Verbindungen mit HOPFF'scher ultrazentrifugierter (HOUZ) AChE⁸ und α -CT. Zudem stellte er die ersten Modellverbindungen (X = Ser, Cys, His) her.

Er machte erste "Gehversuche" mit ^{31}P -NMR Messungen an HOUZ-AChE mit dem Hydrolasemarker DFP zur Untersuchung der Regioselektivität der Inhibition⁹. Die chemische Verschiebung der inhibierten AChE wies eindeutig auf einen Serinester¹⁰ hin. Die gewünschte Information über den stereochemischen Verlauf der Inhibition¹¹ an der AChE (Inversion vs. Retention, vgl. **Schema 7**, S. 21) konnte nicht erhalten werden, da die eingesetzten Inhibitoren¹² nach der Bildung des Phosphoenzymkomplexes zu instabil (Ringöffnung) waren und somit die stereochemische Information verloren ging.

8 Von Prof. Dr. W. H. HOPFF, damals Institut für Pharmakologie der Universität Zürich, erhaltenes Präparat.

9 AChE wurde mit Diisopropylfluorophosphat (DFP) inhibiert, da sich die ^{31}P -NMR-Spektren der Enzym-Inhibitor-Addukte mit seinem Inhibitor (*trans*-Decalin mit axial stehendem X = ODNP) zuerst nicht interpretieren liessen.

10 Durch den Vergleich mit den ^{31}P -chemischen Verschiebungen der synthetischen Modellverbindungen konnte eindeutig zwischen P–O–Ser, P–S–Cys und P–N–His unterschieden werden.

11 Aufgrund der relativen Konfiguration am P-Atom und der davon abhängigen chemischen Verschiebung im ^{31}P -NMR-Spektrum kann zwischen axialem und equatorialem Enzym-Inhibitor-Addukt unterschieden werden (vgl. **Schema 7**, S. 21).

12 Es sind die *trans*-Organophosphate mit axial und equatorial stehenden X = Cl (nur ax) und ODNP (ax, eq) gemeint.

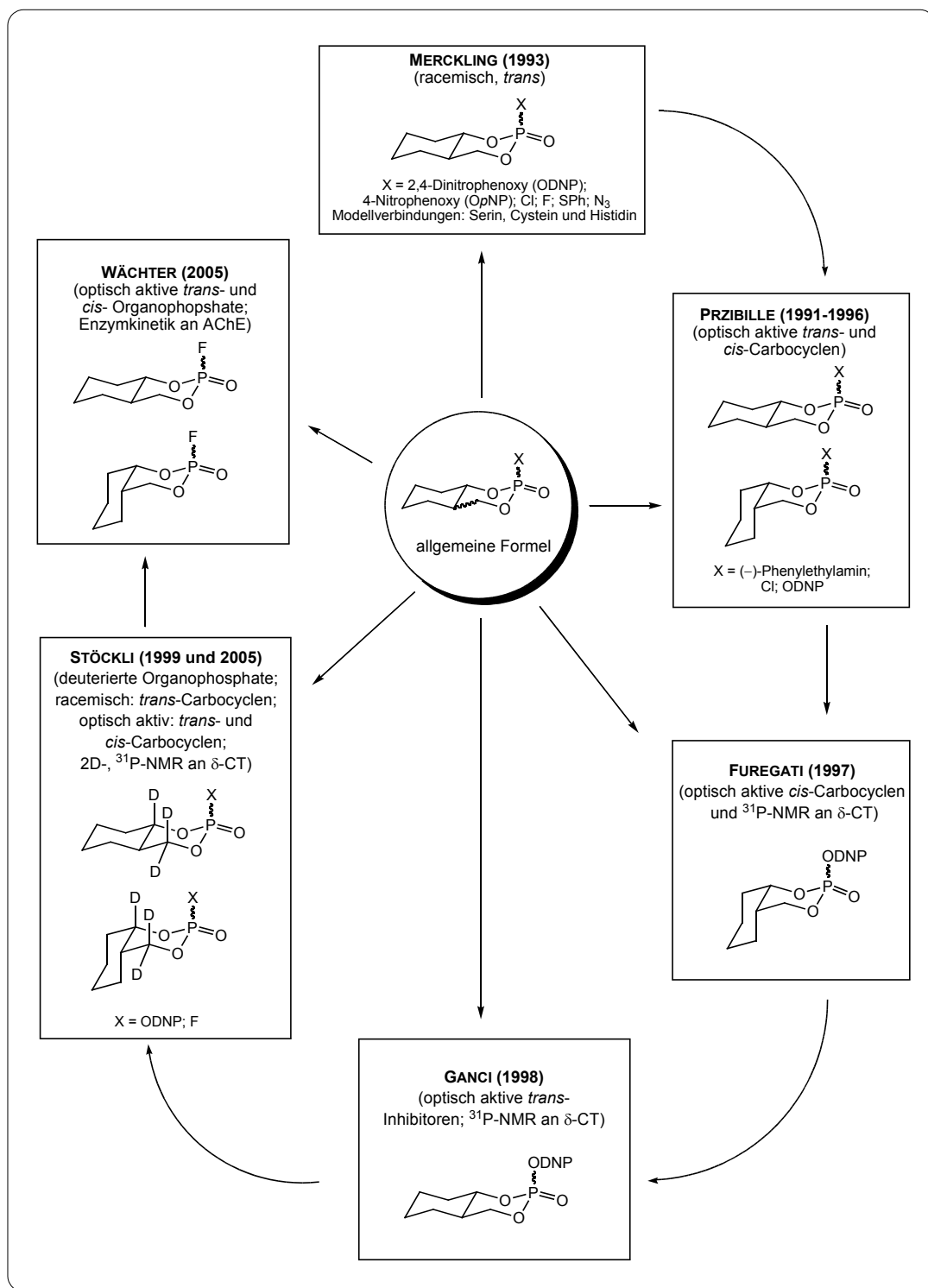


Abbildung 6: Bisherige Arbeiten auf dem Gebiet der carbocyclischen Organophosphate.

PRZIBILLE [59] (siehe auch [60]) hat in der Folge die optisch aktiven carbocyclischen *trans*- und *cis*-Organophosphate ($X = (-)\text{-Phenylethylamin, Cl, ODNP}$) durch klassische Racematspaltung oder Hefereduktion von Vorläufersubstanzen hergestellt.

Er führte mit diesen Verbindungen kinetische Messungen an δ -Chymotrypsin (δ -CT) und HOUZ-AChE durch. Mittels Röntgenstruktur bestimmte er die absolute Konfiguration am P-Atom mit optisch aktivem 1-Phenylethylamin substituierten Derivaten und erarbeitete eine Methode zur Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse (*ee*) mit Hilfe von ^{31}P - und ^{13}C -NMR-Analysen.

GANCI und MEIER¹³ etablierten mit den optisch aktiven, carbocyclischen *trans*-Inhibitoren mit X = ODNP und den racemischen carbocyclischen Serin-Modellverbindungen die ^{31}P -NMR Experimente zur Bestimmung des stereochemischen Verlaufs der Inhibition an δ -CT¹⁴ (Inversion vs. Retention **Schema 7**, S. 21). Dabei stellten sie fest, dass die Inhibitoren mit axialem X = ODNP mit dem Modellenzym δ -CT unter Inversion der Konfiguration am Phosphor reagieren, während die equatorialen Epimeren sowohl unter Inversion wie auch Retention reagieren [61]. Ihre Resultate sind in **Schema 8** (S. 26) zusammengefasst.

FUREGATI [62] stellte im Rahmen seiner Diplomarbeit optische aktive carbocyclische *cis*-Organophosphate mit X = ODNP her. Er reduzierte die β -Ketoester mit Hilfe der NOYORI-Reduktion zu den enantiomeren Hydroxyestern. Auf der Stufe der Hydroxyester konnten die *cis*- und *trans*-Diastereoisomere säulenchromatographisch getrennt werden¹⁵. Mittels ^{31}P -NMR Experimenten konnte er zeigen, dass nur das optisch aktive *cis*-Decalin (equatoriales X) das δ -Chymotrypsin irreversibel inhibiert. Er zeigte weiter, dass die Inhibition mit dem Enzym unter Retention der Konfiguration am Phosphor abläuft [63]. Sein Resultat ist in **Schema 8** unten (S. 26) dargestellt.

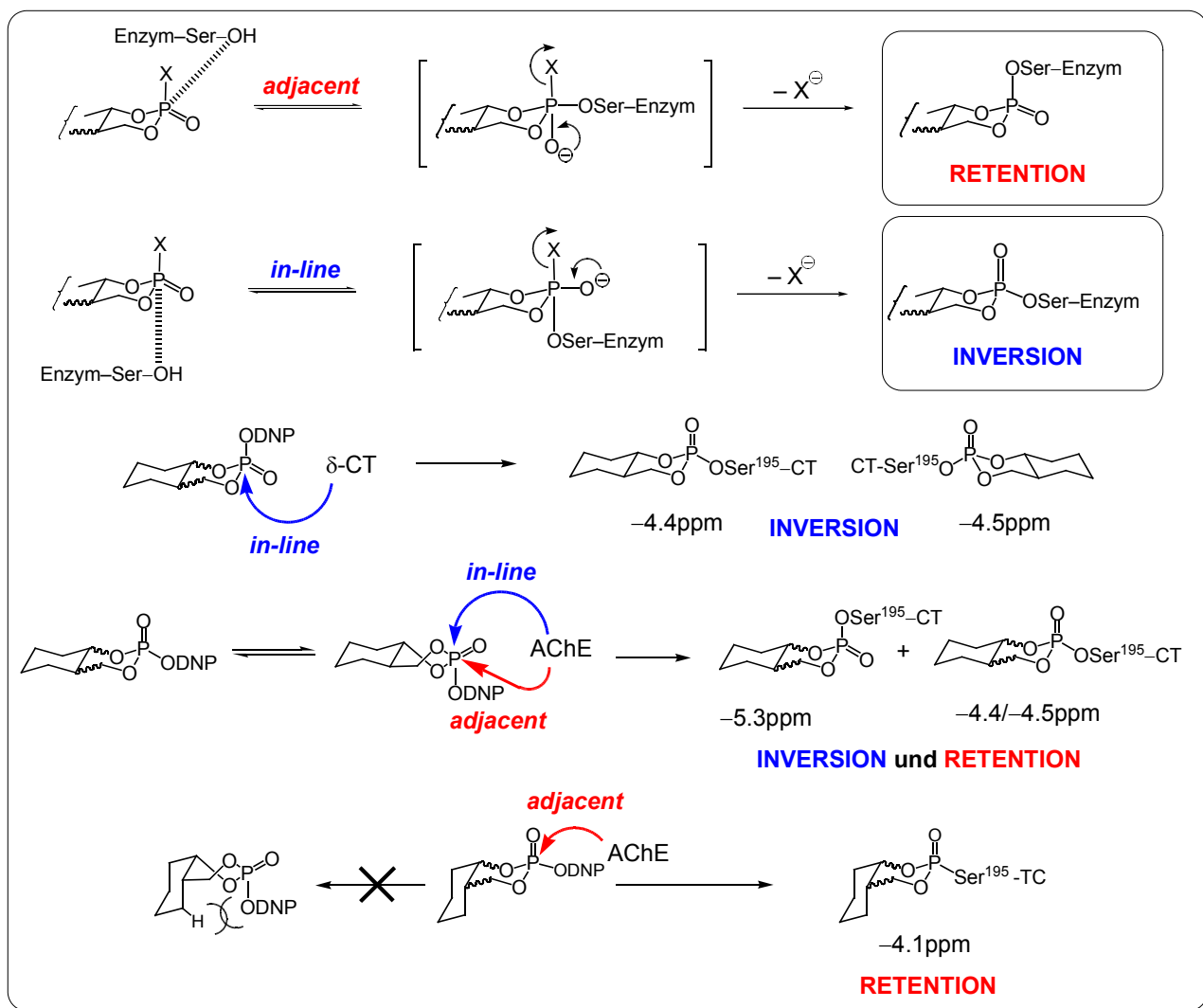
Während meiner Diplomarbeit [1] stellte ich die optisch aktiven *trans*- und *cis*-Decaline mit X = F her und charakterisierte sie mittels Enzymkinetik an EeAChE. Die Verbindungen wurden in dieser Arbeit für verschiedenste Analysen

13 Eric J. M. MEIER war ein NMR-Spezialist aus der Gruppe von Prof. W. VON PHILIPSBORN.

14 δ -CT wurde α -CT als Modellenzym für die AChE vorgezogen, da α -CT bei pH<7 durch Reaktion der freien COOH-Gruppe von Tyr¹⁴⁶ mit His⁵⁷ eines anderen Moleküls dimerisiert, was zu Problemen bei der Interpretation der ^{31}P -NMR-Spektren führen kann. δ -CT enthält zudem zwei Aminosäuren (Thr¹⁴⁷ und Asn¹⁴⁸), welche eine Dimerisierung verhindern.

15 Die *ee*-Werte seiner Verbindungen betrugen jeweils *ca.* 90%.

wiederverwendet. Die Resultate dazu sind im Abschnitt EIGENE ARBEITEN (**Kapitel 5**, S. 41 ff.) zu finden.



Schema 8: Zusammenfassung der Resultate der $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Experimente von FUREGATI [63] und GANCI/MEIER [61] an δ -CT.

RINGEISEN [64] war der erste, der sich auf dem Gebiet der *N*-Heterocyclen versuchte (**Abbildung 7**). Er synthetisierte racemische *cis*- und *trans*-Acetylcholinmimetika und *homo*-Acetylcholinmimetika der Typen **I** und **II** mit $X = \text{Cl}$, ODNP und OpNP und machte kinetische Messungen an α -CT, HOUZ-AChE und SIGMA-AChE¹⁶.

¹⁶ In einigen vergleichenden Messungen wurde ein käufliches AChE-Präparat von SIGMA (EC 3.1.1.7; Type V-S/Lot 128F8040) eingesetzt [24].

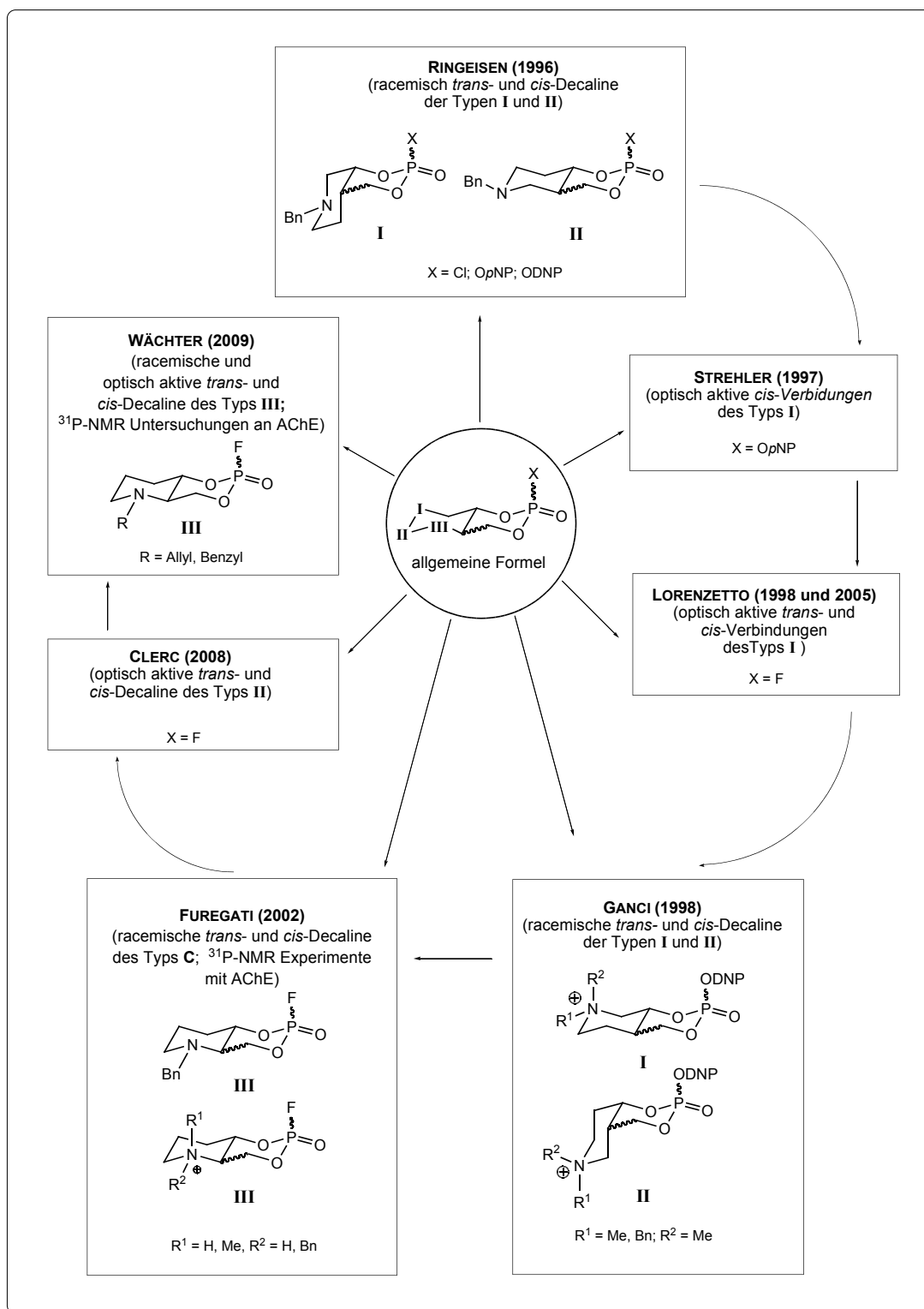


Abbildung 7: Bisherige Arbeiten auf dem Gebiet der N-Heterocyclen.

STREHLER [65] stellte im Rahmen seiner Diplomarbeit optisch aktive N-heterocyclische *cis*-Organophosphate des Typs I mit X = OpNP her und zusätzlich die optisch aktiven *trans*-Diole als Vorläufer der *trans*-Decaline des Typs I. Die

Synthese der enantiomeren Hydroxyester führte er mit Hilfe der Bäckerhefe durch. Die Trennung der *cis*- und *trans*-Hydroxyester erfolgte säulenchromatographisch. Die absolute Konfiguration der Hydroxyester bestimmte er nach der Methode von MOSHER [66] mit (*R*)- und (*S*)-MTPA-Cl. Die *ee*-Bestimmung erfolgte mittels HPLC an CHIRALCEL[®] OD-H¹⁷.

GANCI [67] synthetisierte während seiner Dissertation kationische *N*-heterocyclische Acetylcholinmimetika der allgemeinen Typen **I** und **II** mit X = ODNP. Die *N,N*-Dimethylammonium-Acetylcholinmimetika wurden ausgehend von den *N*-methylierten Piperidindiolen nach [61] hergestellt. Die kinetischen Messungen ergaben aber, dass keines seiner kationischen *N*-heterocyclischen Acetylcholinmimetika als irreversibler Inhibitor von AChE wirkte¹⁸. Zusätzlich wurde eine rasche Epimerisierung am Phosphoratom festgestellt. Nur die Verbindungen mit axialer Abgangsgruppe konnten isoliert werden. GANCI arbeitete bei den Synthesen immer in CHCl₃ als Lösungsmittel. Chlorierte Lösungsmittel können jedoch die Epimerisierung beschleunigen [1].

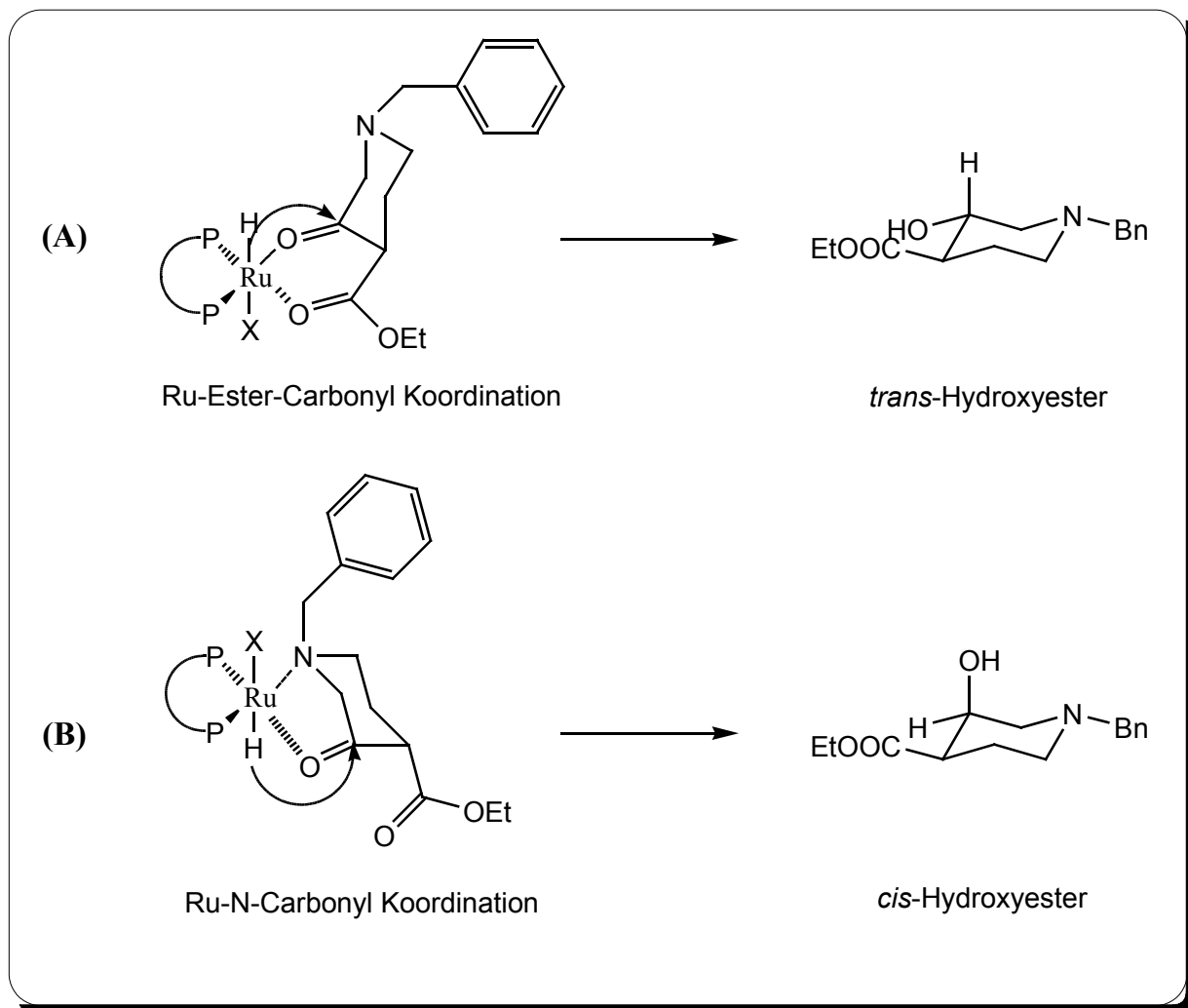
LORENZETTO synthetisierte während seiner Diplomarbeit [69] durch enantioselektive NOYORI-Reduktion mit BINAP-Ru-Katalysatoren optisch aktive Vorläufer der Decaline des Typs **I**. Die absolute Konfiguration bestimmte er nach MOSHER [66] auf der Stufe der Hydroxyester an den (*R*)- und (*S*)-MTPA-Derivaten. Auch hier erfolgte die *ee*-Bestimmung mittels HPLC (CHIRALCEL[®] OD-H)¹⁹. Die tiefen *ee*-Werte beim *cis*-Hydroxyester wurden mit der grösseren sterischen Hinderung durch die Benzylgruppe am N-Atom (Ru-N-Carbonyl Koordination) erklärt, wobei beim Übergangszustand zum *trans*-Hydroxyester (Ru-Ester-Carbonyl Koordination) diese sterische Hinderung eher klein ist (siehe **Schema 9**, S. 29).

17 Der *ee*-Wert des *cis*-Hydroxyesters lag bei 82% und der des *trans*-Hydroxyesters bei 95%.

18 Vom Di-Kation Decamethonium ist bekannt, dass es reversibel an die beiden „anionischen“ Stellen bindet [68]. Bei den Di-Aromaten (N-Benzyl, P-ODNP) könnte ein ähnliches Phänomen vorliegen, wobei es sich aber um Wechselwirkungen zwischen Aromaten handeln würde, was den irreversiblen Angriff des aktivierten Serinrestes am P-Atom verunmöglichen würde. Auch sterische Gründe könnten dafür verantwortlich sein.

19 Die *ee*-Werte für die *trans*-Hydroxyester waren im Bereich von 70 – 80% und für die *cis*-Hydroxyester im Bereich von 40 – 56%.

Während seiner Dissertation [70] stellte LORENZETTO die optisch aktiven Organophosphate des Typs **I** her. Er untersuchte seine Verbindungen mittels enzymkinetischer Messungen an *Ee*AChE.



Schema 9: Erklärung für die schlechten ee-Werte bei der Bildung der *cis*-Hydroxyester mit den Ruthenium-Katalysatoren. $X = \text{Halogenid}, \text{H}_2, \text{H}, \text{LM}$; $\text{P-P} = \text{BINAP}$. (A) zeigt die Koordination des Ketoesters über die Carbonyl- und die Esterfunktion mit dem Hydridangriff von oben an die Carbonylgruppe, was zum *trans*-Hydroxyester führt. (B) zeigt die Koordination über den Stickstoff des Piperidins und die Carbonylfunktion. Der Hydridangriff an die Carbonylfunktion erfolgt von unten, was zum *cis*-Hydroxyester führt. Diese Koordination ist nicht bevorzugt, da die sterisch anspruchsvolle Benzylgruppe die Komplexierung erschwert.

CLERC synthetisierte in seiner Dissertation [71] die optisch aktiven *N*-heterocyclischen

Organophosphate des Typs **II** mit $X = F$. Die Vorläuferdiol derivatisierte er zu den Acetoniden und trennte sie mittels präparativer HPLC (CHIRALCEL[®] OD). Er erzielte *ee*-Werte von >99%. Weiter untersuchte er seine Verbindungen mittels enzymkinetischer Messungen und stellte kein oder nur ein sehr schwaches inhibitorisches Potential fest. Dies verwundert nicht, da diese Verbindungen die Konformationen des unnatürlichen *homo*-ACh's mimetisieren.

Dem aufmerksamen Leser ist nicht entgangen, dass die Arbeiten von STÖCKLI [60][72][73][74] und FUREGATI [2] in diesem Abschnitt nicht besprochen wurden. Da diese Arbeiten für das Verständnis der Resultate der vorliegenden Arbeit von fundamentaler Wichtigkeit sind, werden sie im nächsten Abschnitt etwas detaillierter betrachtet.

4.3 Beweise für die kovalente Bindung der Inhibitoren an das *active site* Serin - einige Kontrollexperimente

Es gibt eine grundsätzliche Schwierigkeit beim Arbeiten mit Enzymen. Enzyme sind wie eine *black box*. Man weiss, was hineingeht und was wieder heraus kommt. Man nimmt zum Beispiel ein interessantes Enzym, mischt einen potentiellen Inhibitor bei und misst die verbliebene Aktivität des Enzyms. Das Resultat dieser Messung gibt uns einen Hinweis auf die Fähigkeit der zugegebenen Verbindung, das Enzym zu hemmen. Die Vorgänge zwischen dem *input* (Zugabe des potentiellen Inhibitors) und dem *output* (Messresultat) bleiben aber unklar. Wir wissen zum Beispiel nicht, ob die Inhibition kovalent oder nicht-kovalent ist. Es lässt sich auch keine Aussage über den Ort der Inhibition machen. Die Inhibition könnte durch Bindung in der Peripherie des Enzyms verursacht werden (allosterische Inhibition). Dabei kann die Enzym-Inhibitor-Bindung (kovalent oder nicht kovalent) zu derart drastischen strukturellen Änderungen im Enzym führen, dass die enzymatische Aktivität verloren geht. Oder die Inhibition findet direkt an der aktiven Seite des Enzyms statt, durch kovalente Bindung an das aktive Zentrum oder durch eine nicht-kovalente Bindung, die den

Zugang zum aktiven Zentrum für das Substrat blockiert. Sollte eine kovalente Bindung vorliegen, ergibt sich ein weiteres Problem. Man weiss noch nicht, an welche Aminosäure der Inhibitor gebunden ist. Alle diese Fragen stellen sich natürlich auch hinsichtlich unseres Forschungsprojektes. In der Folge wird versucht, einige Antworten auf diese Fragen zu geben.

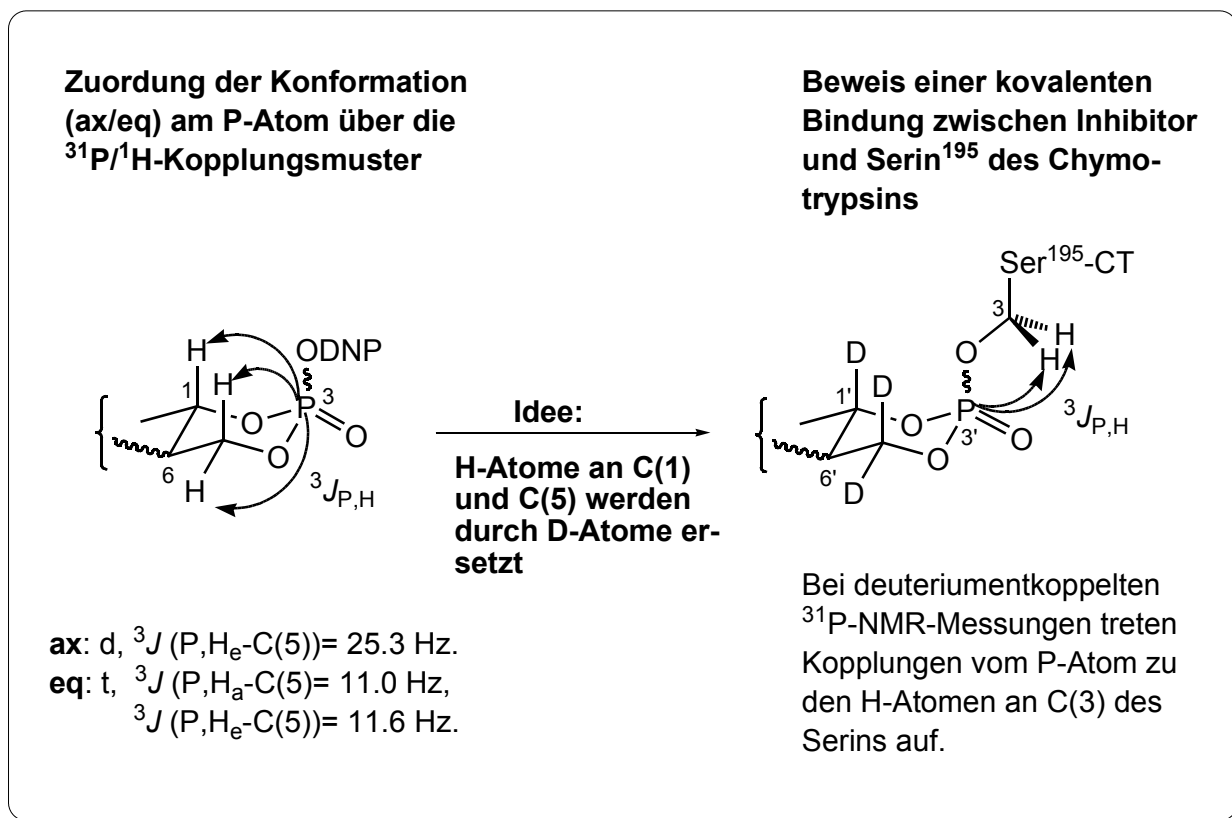
Durch die Erkenntnisse aus vielen wissenschaftlichen Arbeiten [3][13]²⁰, die sich mit der irreversiblen Inhibition von Serinhydrolasen durch Organophosphate beschäftigten, kann man davon ausgehen, dass Organophosphate bevorzugt in der *active site* binden. Selbstverständlich binden sie auch an periphere Aminosäuren, jedoch nicht mit der Häufigkeit, mit der sie im aktiven Zentrum binden. Wenn also eine irreversible Inhibition festgestellt werden kann (Enzymkinetik) und gleichzeitig eine kovalente Bindung des Inhibitors zu einem Serin nachgewiesen werden kann, so handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine kovalente Bindung zum Serin des aktiven Zentrums.

Wie schon in **Kapitel 4.2** beschrieben, konnten MERCKLING (HOUZ-AChE) und GANCI (δ -CT) durch die Analogie zwischen der ³¹P-chemischen Verschiebung des phosphorylierten Enzyms und den ³¹P-chemischen Verschiebungen der synthetischen Modellverbindungen auf eine P-O-Serin Bindung hinweisen. Dies war ein erstes Indiz für eine kovalente Bindung an das *active site* Serin.

Da die Erkenntnisse aus der "Analogie der chemischen Verschiebungen" zwar die Existenz einer kovalenten P-O-Serin Bindung wahrscheinlich machte, aber nicht bewies, stellte STÖCKLI im Rahmen seiner Diplomarbeit [72][73] deuterierte, racemische carbocyclische Organophosphate mit X = ODNP her (siehe **Abbildung 6**, S. 24). Durch aufwändige 2D-NMR-Experimente (³¹P{²H}/¹H-NMR) an vollständig inhibiertem δ -CT konnte er den NMR-spektroskopischen Beweis erbringen, dass das Organophosphat im δ -CT-Inhibitor-Addukt kovalent an einen Serinrest gebunden ist [72][73] (siehe **Schema 10**, S. 32). GANCI [67] und PRZIBILLE [59] hatten zuvor mit

²⁰ Dies sind nur zwei Beispiele einer ganzen Reihe von Literaturhinweisen, die diese Aussage untermauern (vgl. auch **Kapitel Fehler: Referenz nicht gefunden**, S. Fehler: Referenz nicht gefunden)

enzymkinetischen Experimenten an δ -CT nachgewiesen, dass die carbocyclischen Organophosphate mit $X = \text{ODNP}$ irreversible Inhibitoren des Enzyms sind. Vor diesem Hintergrund und nach dem Nachweis einer kovalenten P-O-Ser Bindung konnte die kovalente Bindung ans *active site* Ser¹⁹⁵ als bewiesen betrachtet werden.



Schema 10: Beweis für die kovalente Bindung zwischen Inhibitor und Serin¹⁹⁵.

Während seiner Dissertation [60][74] stellte STÖCKLI die optisch aktiven deuterierten, carbocyclischen Decaline mit $X = \text{ODNP}$ und $X = \text{F}$ her. Mittels $^{31}\text{P}\{^2\text{H}\}/^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie konnte er nicht nur die kovalente Bindung des Organophosphats zum Serinrest nachweisen, sondern auch den grösseren Einfluss der sterisch anspruchsvollen ODNP-Gruppe – gegenüber dem kleinen Fluorid – auf den stereochemischen Verlauf der Reaktion. Er stellte fest, dass die Organophosphate mit $X = \text{ODNP}$ einen stark selektiven stereochemischen Reaktionsverlauf mit dem Enzym zeigen, d.h. die Verbindungen zeigen entweder Retention oder Inversion der Konfiguration am Phosphor. Bei den Fluoridaten ($X = \text{F}$) war der Reaktionsverlauf

eher unselektiv. Wenige Tage nach der Inhibition wurde jeweils Retention und Inversion am P-Atom gefunden. Monate später fand er dann aber nur noch das thermodynamisch günstigere equatoriale Enzym-Inhibitor-Addukt.

Nachdem die Existenz einer kovalenten P-O-Ser¹⁹⁵ Bindung in inhibiertem Chymotrypsin bewiesen war [60][74], stellte FUREGATI während seiner Dissertation [2] racemische *N*-heterocyclische Organophosphate des allgemeinen Typs **III** mit X = F her. Er synthetisierte neben den *Z*-L-Serinmethylester(ZSME)-Modellverbindungen der Decaline auch Serin-Modellverbindungen von Diisopropylfluorophosphat (DFP) und Isopropyl-fluorophosphat (IFP) (siehe auch **Tabelle 2**, S. 36). Die Versuche, die *N,N*-Dimethylammonium-Acetylcholinmimetika des Typs **III** herzustellen, scheiterten nach unzähligen Versuchen²¹.

Er machte umfangreiche Konformationsanalysen mit seinen *N*-Benzyl-Acetylcholinmimetika. Durch die Tatsache, dass die vicinale P–H Kopplung (³*J*(P,H)) über eine modifizierte Karplus-Gleichung mit dem Diederwinkel Φ zwischen der P–O- und der C–H-Bindung (entlang der O–C-Bindung geschaut) verknüpft ist [56]²², konnte die Konformationsanalyse in Lösung durchgeführt werden. Darüberhinaus erbrachten Röntgenstrukturanalysen den erstmaligen direkten Nachweis für den anomeren Effekt bei den Verbindungen mit equatorialen Abgangsgruppen [75]. Dabei befindet sich das F-Atom jeweils in der stereo-elektronisch bevorzugten pseudo-axialen Lage. Er stellte fest, dass der anomere Effekt bei den *trans*-Verbindungen zu einer *Twist-Boat*-Konformation des Oxaphospharinges führt. Bei den *cis*-Verbindungen ist die Situation etwas komplizierter, weshalb seine Konformationsanalysen nur zum Teil durch Röntgenstrukturanalysen untermauert werden konnten. Die Befunde bestätigten aber die spektroskopischen Argumente der Konfigurationszuordnung am P-Atom (ax oder eq).

21 Im Allgemeinen ist der Erfolg dieser *N*-Alkylierungen stark abhängig von den Reaktionsbedingungen (Reaktionszeit und Aufarbeitungszeit). Trotz umfangreichen Untersuchungen konnte für das Problem keine Lösung gefunden werden.

22 Die modifizierte Karplusgleichung: ${}^3J_{P,H}(\Phi) = \alpha \cos^2 \Phi + \beta \cos \Phi + \gamma$, wobei $\alpha = 14.79$; $\beta = -8.83$; $\gamma = 1.77$.

FUREGATI führte mit allen seinen Verbindungen enzymkinetische Experimente an *EeAChE* durch. Er machte zudem erste $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Experimente an nativer phosphorylierter *EeAChE*. Aufgrund der komplexen Struktur des Enzyms und der dadurch stark abgeschirmten *active site* konnte er keine aussagekräftigen Spektren erhalten. Es waren nur unspezifische, periphere Phosphorylierungen im Spektrum zu erkennen (siehe **Abbildung 8**, links).

In der Zeit nach seiner Dissertation optimierte er die Messparameter für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen [76][77]. Für die Optimierung inhibierte er *EeAChE* mit dem Serinhydrolasemarker DFP, der dafür bekannt ist, das *active site* Serin kovalent zu phosphorylieren (vgl. auch **Abbildung 9**, S. 35 , [45][78][79]).

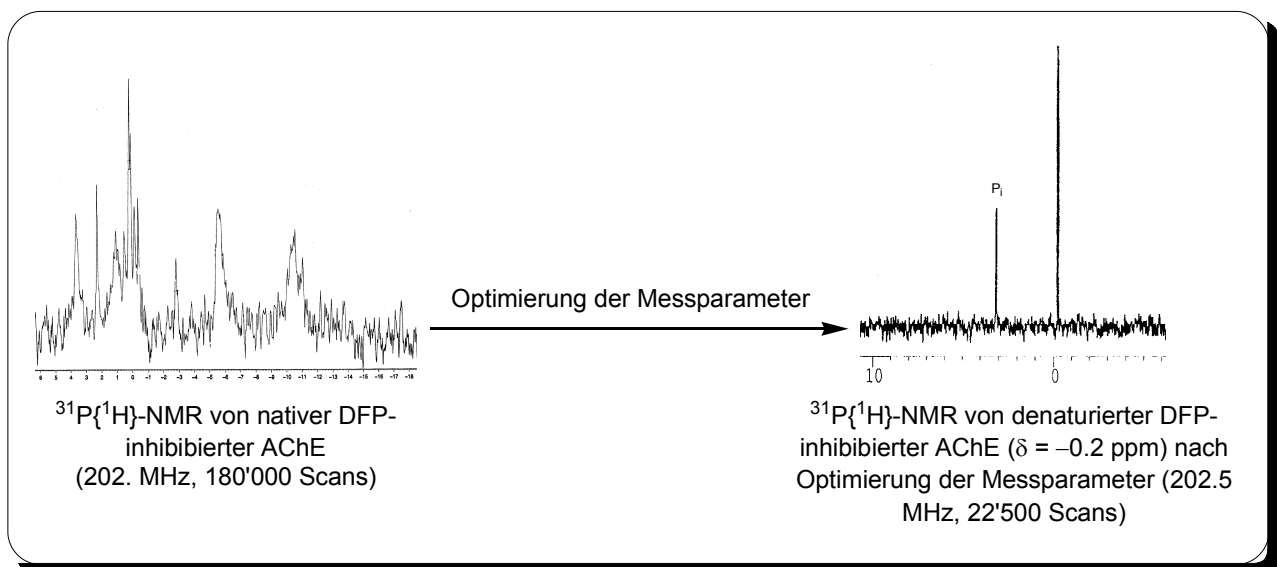


Abbildung 8: Auf der linken Seite sieht man das uninterpretierbare $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum der nativen DFP-inhibierten *EeAChE*. Die Signale von unspezifisch phosphorylierten peripheren Stellen überlagern das Signal der phosphorylierten *active site*. Auf der rechten Seite sieht man das intensive Signal der phosphorylierten *active site* nach Optimierung der Messparameter [76][77].

Nach langwierigen Untersuchungen wurde klar, dass das Enzym unter den ursprünglichen Messbedingungen entgegen allen Erwartungen in nativer Form vorlag und deshalb kein NMR-Signal der phosphorylierten *active site* sichtbar gemacht werden konnte. Es wurde daher intensiv nach denaturierenden Bedingungen gesucht.

Schlussendlich fand man heraus, dass das Enzym in D₂O mit 6 M Guanidin-d₅·DCl, 50 mM NaOAc und pH = 4.00 ± 0.02 denaturierte und man konnte zum ersten Mal ein ³¹P-Signal der phosphorylierten *active site* auflösen (siehe **Abbildung 8**, rechts).

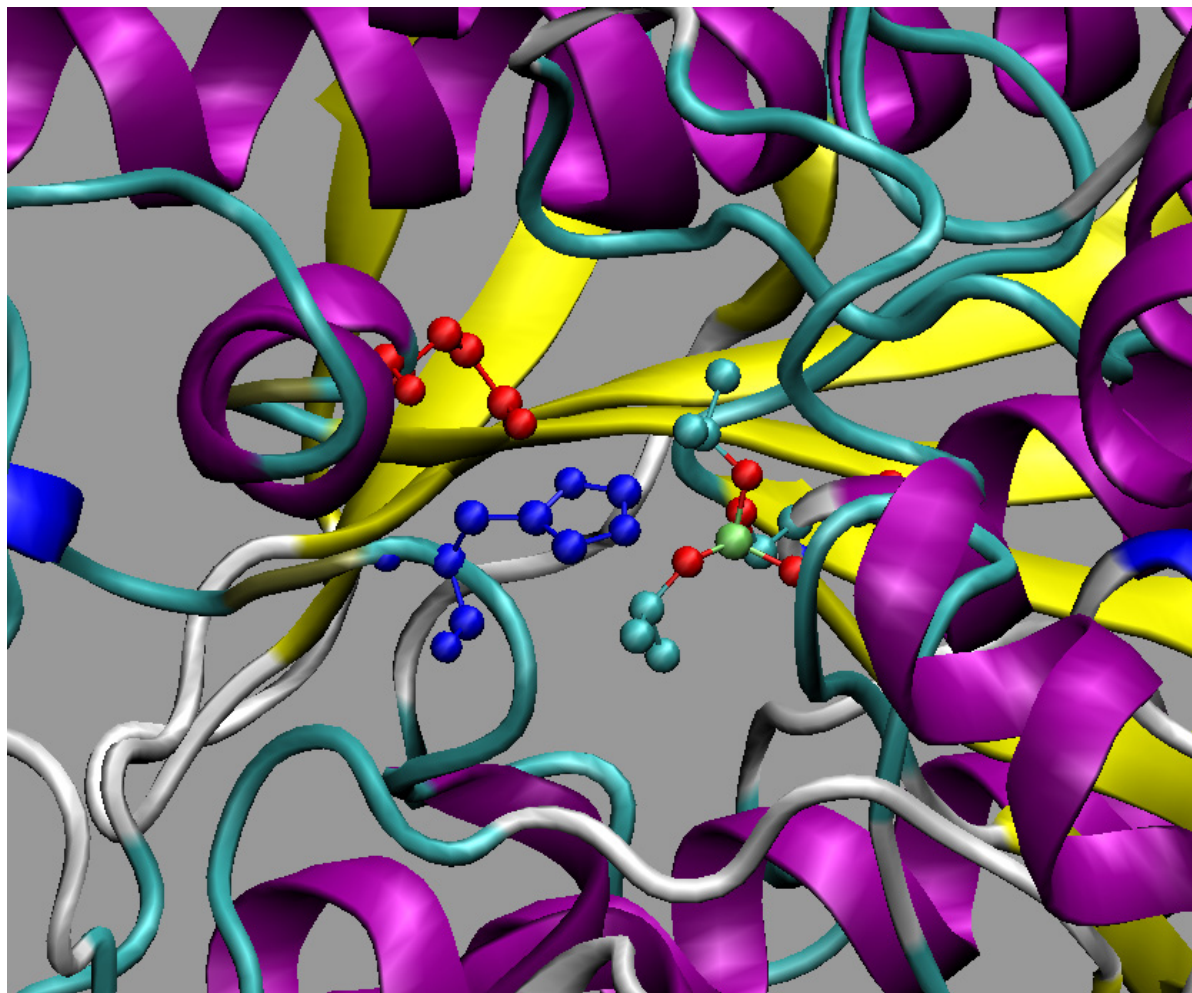


Abbildung 9: Kristallstruktur von AChE (Maus) mit kovalent gebundenem DFP in der active site [79]. **blau:** active site His⁴⁴⁷; **rot:** active site Glu³³⁴; **vielfarbig:** DFP gebunden an Ser²⁰³.

Durch den Vergleich mit den synthetischen Modellverbindungen des DFP und des dealkylierten IFP (gealtertes DFP) in **Tabelle 2** (S. 36) konnte man so eine kovalente Bindung von IFP mit dem *active site* Ser²⁰² nachweisen. In [80] wurde dieses Enzym-Inhibitor-Addukt auch schon kristallographisch nachgewiesen.

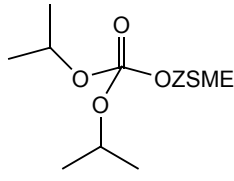
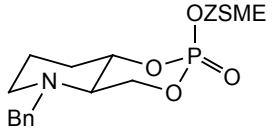
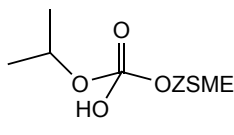
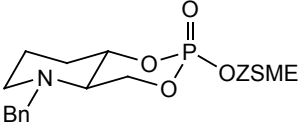
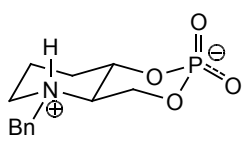
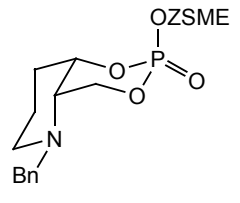
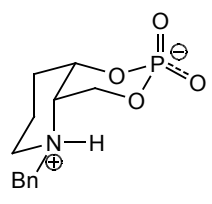
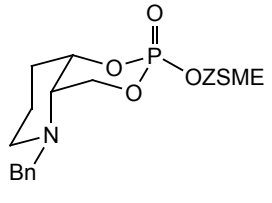
	$\delta (^{31}\text{P})$ $\text{pH} = 4.00 \pm 0.02$		$\delta (^{31}\text{P})$ $\text{pH} = 4.00 \pm 0.02$
	- 3.0		- 6.8
	- 0.1		- 3.3
 Hydrolyseprodukt	- 3.3		- 6.9
 Hydrolyseprodukt	- 3.3		- 3.3

Tabelle 2: Modellverbindungen und Hydrolyseprodukte in 6 M Guanidin-DCl/D₂O/Acetat; $\text{pH} = 4.00 \pm 0.02$; 300K. Als interne Referenz wurde POPh_3 ($\delta \approx +36.5$ ppm) verwendet und auf eine 85% H_3PO_4 -Kapillare geeicht. Das anorganische Phosphat (Pi) wird um $\delta \approx +1$ ppm detektiert.

Nach diesem Durchbruch war der Weg frei für die Untersuchung des stereochemischen Verlaufs der Inhibition mit den *trans*- und *cis*-Decalinen des Typs **III**. Die Inhibition der *trans*-Organophosphate läuft unter **Inversion** und **Retention** der Konfiguration am P-Atom ab, und die des *cis*-Decalins (axiale Abgangsgruppe) läuft spezifisch unter **Retention** der Konfiguration ab, wie durch die Spektren in **Abbildung 10** (S. 37) gezeigt wurde [77].

Im $^{31}\text{P}, ^1\text{H}$ -HMQC Spektrum des *cis*-Decalins (axiale Abgangsgruppe) trat zusätzlich ein Kreuzpeak für den Wasserstoff $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5)$ mit dem Phosphor auf

($^3J(\text{P}, \text{H}_{\text{eq}}-\text{C}(5)) \approx 23$), was bewies, dass das Decalin als Ganzes noch intakt war. Da durch die Dialyse nach der Inhibition sämtliche nicht an das Enzym gebundenen organischen Moleküle herausgefiltert wurden, war dies ein eindeutiger Hinweis, dass es sich um den an das Enzym gebundenen Inhibitor handelte. Ein Kreuzpeak für das CH_2 -Ser mit dem Phosphor konnte hingegen, aufgrund der schwächeren Kopplung (erwartete $^3J(\text{P}, \text{CH}_2\text{-Ser}) \approx 6$), nicht detektiert werden. Das equatoriale *cis*-Decalin inhibierte nur reversibel (Enzymkinetik), wodurch es sich nicht für die NMR-Untersuchungen eignete.

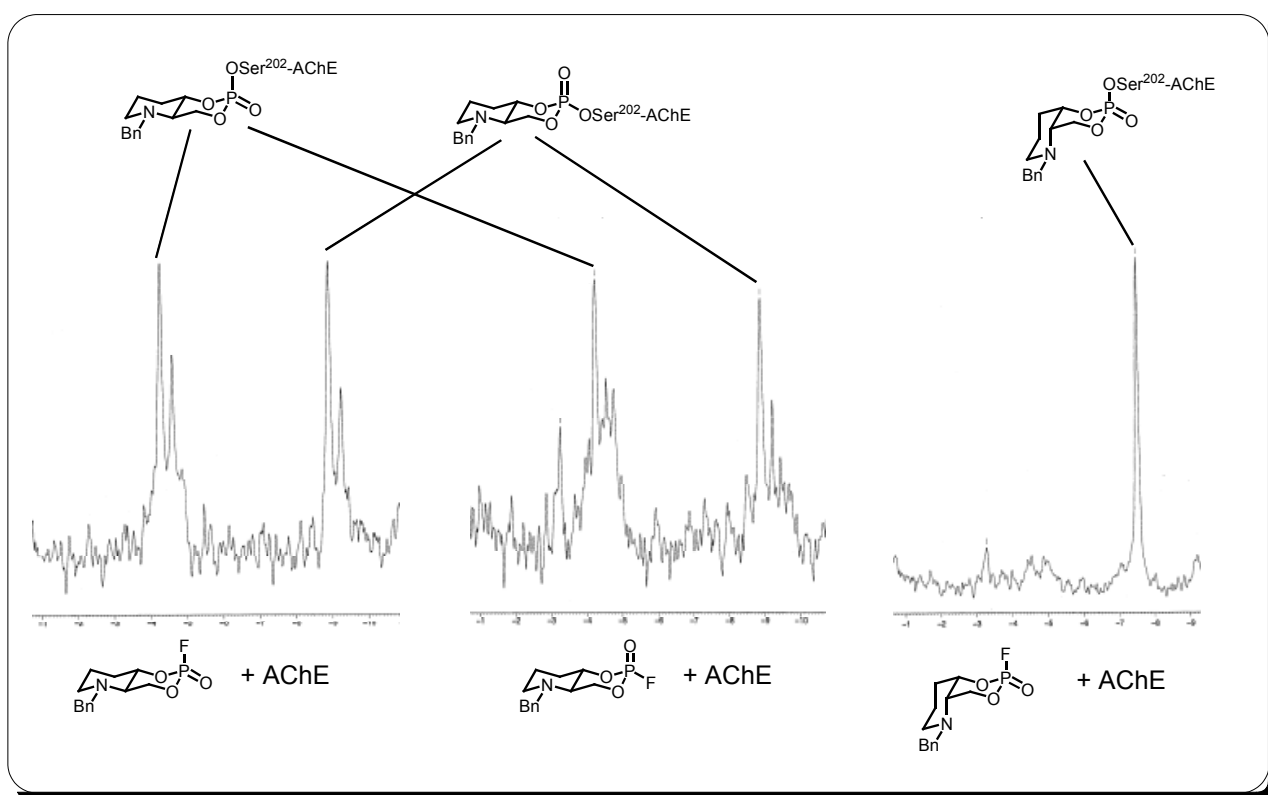
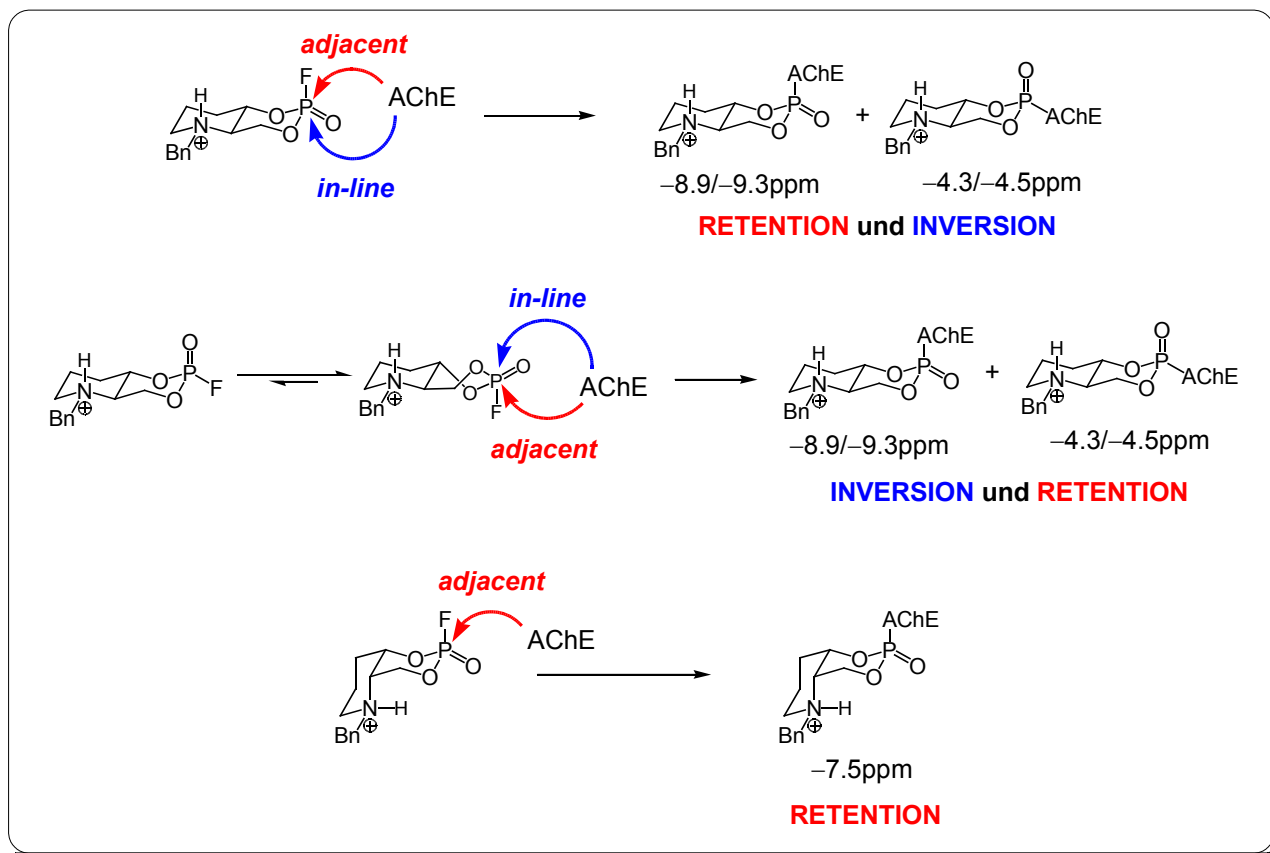


Abbildung 10: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektren von FUREGATI an inhibierter EeAChE.

Diese Resultate konnten anschliessend einleuchtend rationalisiert werden (vgl. **Schema 11**, S. 38). Es scheint klar, dass die *trans*-Decaline für den Serinangriff von oben und unten zugänglich sind, was zu **Retention** (*adjacent attack*) und **Inversion** (*in-line attack*) der Konfiguration am P-Atom führt. Das *cis*-Decalin wiederum kann vom Serin nicht von unten angegriffen werden, da der Piperidinring eine sterische Hinderung verursacht. Deshalb wird auch nur **Retention** (*adjacent*

attack) der Konfiguration am Phosphor beobachtet.

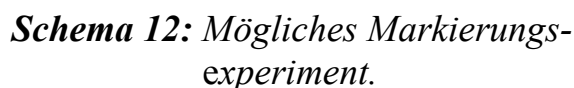


Schema 11: Mechanistische Rationalisierung der $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Experimente an EeAChE von FUREGATI.

Weiterführende Kontrollexperimente wären natürlich die Kristallisation des inhibierten Enzyms. Dies wäre allerdings auch nur eine weitere Momentaufnahme und würde keine Erkenntnisse über die Vorgänge während der Reaktion liefern. Zudem ist das Kristallisieren von Enzymen etwas für Experten und kann ganze Dissertationszeiten ausfüllen. Daher war dies für uns keine Option.

Inspiziert durch die Arbeit von BOURNE [41] wären auch Experimente mit einer mutierten AChE (S203A) denkbar. Würde man nach der Inhibition und Dialyse der mutierten AChE (kein *active site* Serin) keine Signale für den Inhibitor im $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum sehen, so wäre bewiesen, dass die Signale in **Abbildung 10** nicht von einer phosphorylierten peripheren Stelle herrühren, sondern höchstwahrscheinlich von der *active site*. Sähe man jedoch Signale mit den gleichen chemischen

Um bei den NMR Untersuchungen zu bleiben, könnte man auch ein Markierungsexperiment durchführen. Dazu bräuchte man eine Serinhydrolase mit ^{13}C markiertem *active site* Serin. Nach der Inhibition könnte man dann die $^2J(\text{P}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung messen (**Schema 12**). Das Problem hier liegt jedoch bei der Beschaffung oder Herstellung des markierten Enzyms.



Der ^{31}P -NMR-Spektroskopie kommt im gesamten Forschungsprojekt – auch in der vorliegenden Arbeit – zur Strukturaufklärung bei den Phosphadecalinen eine zentrale Bedeutung zu (Siehe **Kapitel 5.7**, S. 86 ff. und **Kapitel 5.9**, S. 139 ff.).

-39-

Es gibt drei wichtige Faktoren, die die chemische Verschiebung in der ^{31}P -NMR-Spektroskopie beeinflussen [81]:

- die Bindungsgeometrie (Winkelabhängigkeit der chemischen Verschiebung)
- die Elektronegativität der Substituenten am Phosphor
- die relativen π -Bindungsanteile

Zu diesen Faktoren kommt noch die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von äusseren Faktoren hinzu, wie Temperatur, Lösungsmittel, pH-Wert usw.

Aufgrund der Winkelabhängigkeit der ^{31}P -NMR chemischen Verschiebung sind die meisten Verbindungen (Ausnahme siehe **Kapitel 5.4**, S. 74) mit equatorial stehendem X (X = OR, F usw.) am P-Atom gegenüber den axialen Epimeren tieffeld-verschoben ($\Delta\delta = 3 - 6$ ppm). Dies gilt allgemein für Organophosphate mit *cis*- oder *trans*-Decalingerüst [56]. Die Differenz der chemischen Verschiebungen nimmt jedoch mit der Zunahme der Elektronegativität des Substituenten X am Phosphor ab. Bei X = F kann sie gegen null gehen oder sogar umkehren, wie später gezeigt wird.

Besser geeignet für die Zuordnung von axial bzw. equatorial sind daher die $^3J_{\text{P,H}}$. Wie schon in [56][81] beschrieben, ist die $^3J_{\text{PH}}$ -Kopplung am grössten, wenn der Diederwinkel Φ zwischen P–O- und C–H-Bindung (entlang der C–O-Bindung gesehen) 180° beträgt und am kleinsten, wenn er 60° beträgt. Die Diederwinkel haben bei den axial- und equatorial substituierten Verbindungen genau diese Werte, wenn jeweils Doppelsesselkonformationen vorliegen. Durch den anomeren Effekt liegen die equatorial substituierten Verbindungen jedoch nur selten in der Sessel-Konformation vor. Der Substituent X (X = OR, X usw.) wird vielmehr in pseudo-axialer Position gefunden. Dadurch beeinflusst der anomere Effekt in erheblichem Masse die verschiedenen Diederwinkel Φ , was dazu führt, dass sich auch die $^3J_{\text{PH}}$ -Kopplungen ändern. Somit lassen sich die axial und equatorial substituierten Verbindungen aufgrund der unterschiedlichen Kopplungsmuster voneinander unterscheiden.

5. EIGENE ARBEITEN

Auf den folgenden Seiten wird beschrieben, wie die gestellten Fragen beantwortet und die gesteckten Ziele erreicht wurden.

5.1 Ziele der vorliegenden Arbeit

Das Ziel dieser Disseration war die Synthese und die vollständige Charakterisierung der acht optisch aktiven *trans*- und *cis*-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7-benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxide (Typ **III**, vgl. **Abbildung 4**, S. 18) mit konformativ und konfiguratv definiertem Decalingerüst als Acetylcholinmimetika. Neben der Bestimmung der chiroptischen und spektroskopischen Daten wurden die Verbindungen mittels Enzymkinetik und ^{31}P -NMR Experimenten auf ihre inhibitorischen Eigenschaften an Acetylcholinesterase (AChE) untersucht.

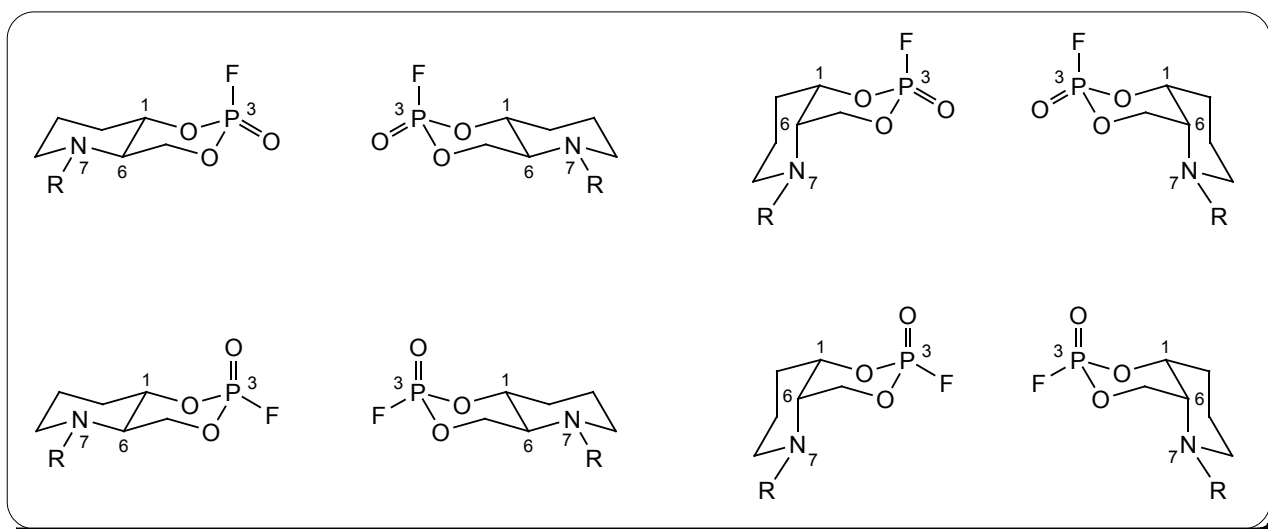


Abbildung 11: Übersicht zu den hergestellten Acetylcholinmimetika. Optisch aktiv:
R = Benzyl; Racemisch: *R* = Allyl

Zusätzlich wurden auch racemische *trans*- und *cis*-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7-allyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxide hergestellt, um den sterischen Einfluss des Substituenten am Stickstoff auf die Inhibition etwas näher zu beleuchten. Zudem

bietet die Allylgruppe interessante Möglichkeiten, den Inhibitor zu modifizieren (siehe **Abbildung 11**).

Mit den carbocyclischen Organophosphaten (Typ **IV**) aus [1][82] und den 7-Aza Verbindungen (Typ **III**) wurden mittels ^{31}P -NMR Spektren Konformationsanalysen in Lösung durchgeführt. Da die eindeutige Analyse *via* ^{31}P -NMR bei den *cis*-equatorialen²³ carbocyclischen und den *cis*-equatorialen²³ 7-Aza Verbindungen nicht möglich war, wurden mit diesen Organophosphaten aufwändigere NOE Experimente gemacht.

5.2 Enantiomerentrennung mit HPLC

PRELOG und WIELAND waren 1944 die ersten, die erfolgreich eine direkte chromatographische Enantiomerentrennung an (+)-Lactosehydrat durchführten [83]. Heutzutage ist die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) als effiziente und vielseitige Analysemethode aus keinem modernen Labor mehr wegzudenken. Dank der kinetischen Leistungsfähigkeit der HPLC (hohe Zahl an theoretischen und effektiven Trennstufen) und ihrer thermodynamischen Vorzüge (stabile, hochselektive Phasen) können geringste Energieunterschiede in den diastereoisomeren Wechselwirkungen zu einer Trennung führen [84].

Enantiomere lassen sich auf herkömmlichen achiralen Phasen nicht unterscheiden, da sie sich in ihren physikalischen Eigenschaften gleich sind. Die optische Drehung von polarisiertem Licht ist hier die einzige Ausnahme. Daher braucht es optisch aktive Hilfsstoffe ("chirale Selektoren"), die mit den Enantiomeren in diastereoisomere Wechselwirkungen treten. Es bilden sich *in situ* diastereoisomere Assoziate, welche sich in ihren physikalischen Eigenschaften nun unterscheiden und daher eine chromatographische Trennung ermöglichen. In **Abbildung 12** ist das fundamentale "3-Punkte-Modell der chiralen Erkennung" gezeigt. Zur Bildung von stabilen

²³ Im weiteren Verlauf der Arbeit wird der Einfachheit halber mit dieser Art Ausdruck gearbeitet. Dabei bedeutet *cis-equatorial* nichts anderes als: *cis*-Decalin mit equatorial stehender Abgangsgruppe X.

Molekülkomplexen müssen gleichzeitig 3 intermolekulare Donor- oder Akzeptor-Wechselwirkungen auftreten (H-Brücken, π - π -, Dipol-Dipol-, hydrophobe-WW, sterische Abstossung, usw.). Von diesen muss mindestens eine stereospezifisch das Asymmetriezentrum involvieren. Das Modell ist eine sehr vereinfachte Darstellung der Zusammenhänge. Es ist aber nach wie vor ein gutes Modell, das zum Verständnis von enantioselektiven Trennmechanismen beitragen kann [84][85].

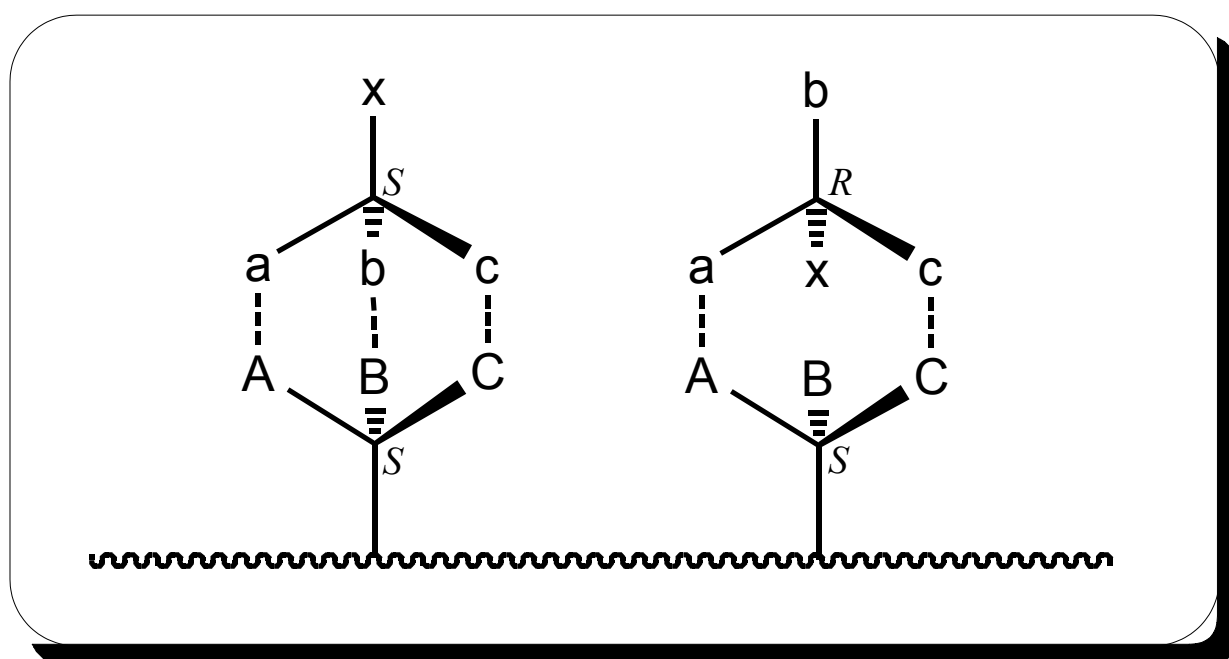


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Bildung von diastereoisomeren Assoziaten an optisch aktiven stationären Phasen. Das (RS)-Assoziat ist in dieser Abbildung das weniger stabile und eluiert früher [84].

Man kann Enantiomere chromatographisch auf drei grundlegende Arten voneinander trennen:

1. Derivatisierung mit einem optisch reinen Hilfsreagenz und anschliessender chromatographischer Trennung an achiraler Phase.
2. Direkte Trennung an optisch aktiver stationärer Phase mit achiralen Lösungsmitteln
3. Direkte Trennung an achiraler stationärer Phase mit optisch aktiver mobiler Phase

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Trennmethode nach 2. Art gearbeitet. Es wurde mit Cellulosecarbamat (3,5-Dimethylphenylcellulose Carbamat, CHIRALCEL[®] OD) beschichtetes Silicagel als stationäre Phase verwendet (siehe **Abbildung 13**). Diese Art der stationären Phase ist sehr effizient und belastbar und eignet sich deshalb auch für die präparative Trennung von Enantiomeren.

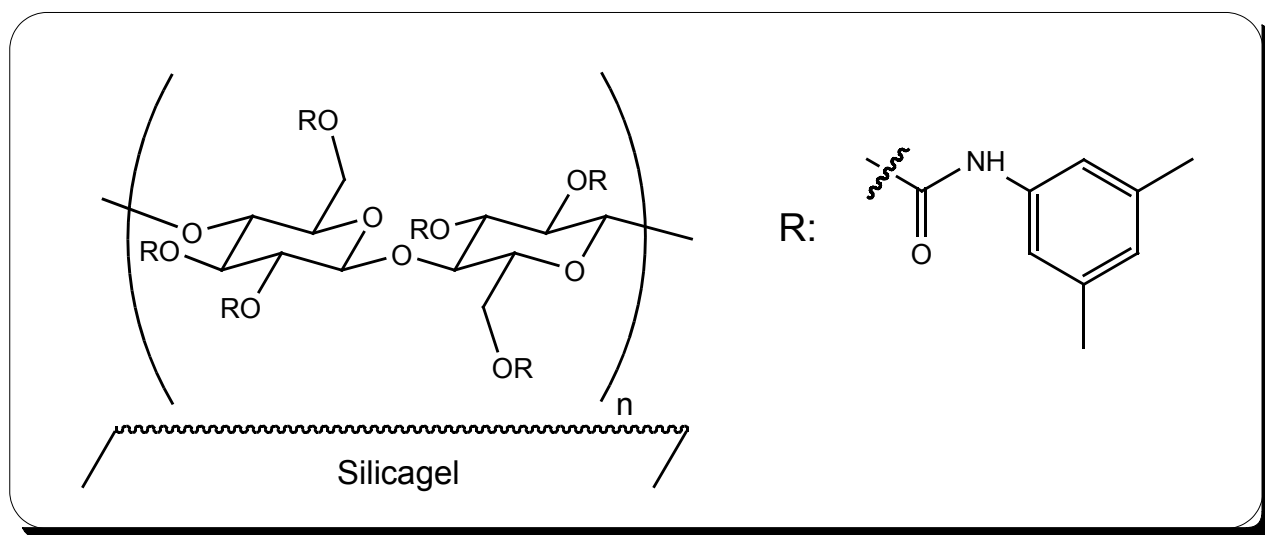


Abbildung 13: In der vorliegenden Arbeit verwendete optisch aktive stationäre Phase (nicht chemisch gebunden).

Die Verwendung von optisch aktiven mobilen Phasen an achiralen stationären Phasen für die präparative Trennung von Enantiomeren kommt nicht in Frage, da die Auswahl aufgrund ihrer ungünstigen physikalischen Eigenschaften (Detektorverträglichkeit, Viskosität) stark limitiert ist. Dazu kommt, dass solche Lösungsmittel nicht in grossen Mengen verfügbar und zudem relativ teuer sind. Daher sind solche Methoden vornehmlich von akademischem Interesse [84].

In der praktischen Anwendung der Enantiomerentrennung dient die mobile Phase hauptsächlich zum Einstellen der Retentionszeiten. Die Selektivität wird durch die optisch aktive stationäre Phase gewährleistet. Bei den oben beschriebenen Cellulosederivaten werden vor allem Kohlenwasserstoff/Alkohol-Gemische sowie die für normale Phasen üblichen Lösungsmittel verwendet. Die Flussraten bei der Enantiomerentrennung sind in der Regel tiefer als bei der achiralen HPLC

(<1ml/min), da die Gleichgewichtseinstellung zu den diastereoisomeren Assoziaten relativ langsam ist. Möglichst tiefe Temperaturen bringen eine bessere Trennschärfe, da die Stabilität der diastereoisomeren Assoziat zunimmt und die Löslichkeit der Enantiomere in der mobilen Phase abnimmt [84].

Wichtig ist auch die Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung (*ee*-Werte) von enantioselektiven Reaktionen. Für eine genaue Bestimmung braucht es neben hoher Selektivität der Phasen, vor allem eine hohe Auflösung, um auch kleine *ee*-Werte noch verlässlich messen zu können (vgl. **Kapitel 5.2.1**).

5.2.1 Einige wichtige Kenngrößen der Chromatographie

Bei der chromatographischen Trennung von Substanzen muss man zwischen kinetischen und thermodynamischen Effekten unterscheiden. Bei der HPLC wird die Kinetik durch die Güte der verwendeten Säule (Packungsfaktor, Korngrösse), die Temperatur und die Viskosität der mobilen Phase bestimmt. Die kinetischen Effekte einer Trennung, wie Zonendispersion durch Fluss-Anisotropie, Diffusion und Massentransfer (Sorption-Desorption), die *a priori* gegen eine gute Trennung arbeiten [86], zeigen sich in der Schärfe der Peaks. Je schärfer, desto optimaler sind die kinetischen Eigenschaften und desto effizienter ist das Trennsystem. Die Effizienz lässt sich durch die Verwendung von möglichst kleinen Partikeln, dichten Packungen und möglichst schwach viskosen Lösungsmitteln weiter steigern.

Die Kenngrößen, welche die Effizienz des Systems beschreiben, sind die Bodenzahl $N_{theor.}$ resp. $N_{eff.}$ und die Bodenhöhe $H_{theor.}$ resp. $H_{eff.}$. (vgl. **Gleichung 1** und **2** und **Abbildung 14**). Die Bodenzahl beschreibt die Anzahl theoretischer resp. effektiver Böden in einer Säule, an denen die Moleküle einer Substanz thermodynamische Wechselwirkungen (Einstellung des Phasengleichgewichtes) mit der stationären Phase haben können. Aber nicht jedes Molekül hat an jedem Boden eine Wechselwirkung. Es gibt eine bestimmte Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül an einem Boden wechselwirkt. Das heisst, dass jeder neue Boden eine erneute Chance

The diagram illustrates a normal distribution curve with the following parameters and labels:

- Peak Höhe [%]:** The y-axis represents the peak height in percentage, with marked values at 4.4, 13.4, 32.4, 50.0, 60.7, 88.2, and 100.0.
- Inflexionspunkte:** Points on the curve where the curvature changes, located at approximately 60.7% of the peak height.
- $w_i = 2\sigma$:** The width of the curve at the inflection points.
- $w_h = 2.354\sigma$:** The width of the curve at the 50.0% height level.
- 3σ :** The width of the curve at the 32.4% height level.
- 4σ :** The width of the curve at the 13.4% height level.
- 5σ :** The width of the curve at the 4.4% height level.
- $w = 4\sigma$:** The total width of the curve at the 4.4% height level.
- a and b :** Horizontal distances from the center to the edges of the curve at the 4.4% height level.

Bei einer guten, 25 cm langen HPLC-Säule mit 5 μm Partikeldurchmesser sind Bodenzahlen um *ca.* 15'000 wünschenswert ($N_{\text{geschätzt}} \approx 3000 \cdot L/d_p$, [87]). Bei der Bodenhöhe ist die Abhängigkeit reziprok. Die Bodenhöhe kann aber nicht kleiner als der Partikeldurchmesser (d_p) sein. Eine Faustregel besagt, dass eine gute Säule eine

Bodenhöhe von *ca.* zwei- bis dreimal der Grösse des Partikeldurchmessers (d_p) hat. Bei einer Säule mit Partikelgrösse $\sim 5 \mu\text{m}$ macht dies eine Bodenhöhe von *ca.* 10-15 μm .

$$N_{\text{theor.}} = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 4 \cdot \left(\frac{t_R}{2\sigma} \right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{2.354\sigma} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{4\sigma} \right)^2 \quad (1)$$

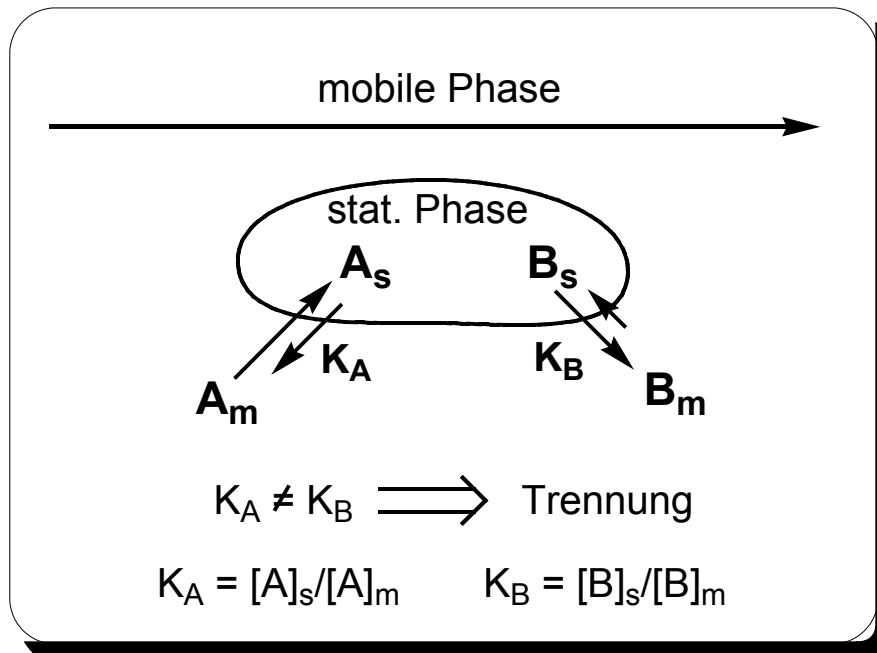
$$N_{\text{eff.}} \rightarrow t_R \text{ durch } t_R' \text{ ersetzen} \quad t_R - t_0 = t_R'$$

$$H_{\text{theor.}} = \frac{L}{N_{\text{theor.}}} \quad H_{\text{eff.}} = \frac{L}{N_{\text{eff.}}} \quad L = \text{Länge der Säule} \quad (2)$$

$$A_s = \frac{b}{a} \text{ (bei 10\% Peakhöhe), } A_s > 1 \rightarrow \textit{tailing} \quad (3)$$

Die hohe Leistungsfähigkeit (*High Performance*) der HPLC (kurze Messzeiten, scharfe Peaks, usw.), ist also auf die Optimierung von kinetischen Effekten zurückzuführen.

Für die eigentliche Trennung von Substanzen sind aber thermodynamische Effekte zuständig. Wie schon im **Kapitel 5.2** erwähnt, braucht es für die Trennung von zwei oder mehreren Substanzen unterschiedlich starke Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und den einzelnen Verbindungen (siehe **Abbildung 12**, S. 43). Bei der Trennung von Diastereoisomeren kommt zusätzlich noch die unterschiedliche Löslichkeit der Moleküle in der mobilen Phase zum Tragen. Es handelt sich also bei den thermodynamischen Effekten um Gleichgewichte zwischen Adsorption an die stationäre Phase und Desorption von der Festphase in die mobile Phase, die sich während der Trennung einstellen (siehe **Schema 13**).



Schema 13: Gleichgewichtssituation während der Trennung. Molekül A und B haben unterschiedliche Gleichgewichtskonstanten für die Adsorption-Desorption.

Die Art dieser unterschiedlichen Gleichgewichte (Unterschied der Gleichgewichtskonstanten) bestimmt die Selektivität (**Gleichung 6**) und die Auflösung (**Gleichung 5**) einer Trennung. Die thermodynamischen Effekte sind also verantwortlich für die verschiedenen Retentionszeiten (Kapazitätsfaktoren, vgl. **Abbildung 15** und **Gleichung 4**) von Substanzen und für gewisse nachteilige Effekte wie *tailing* oder *fronting* (Asymmetriefaktor, siehe **Gleichung 3**, S. 47).

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0} \quad (4)$$

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w1 + w2} \quad R_s = 1: 4\sigma\text{-Trennung} \quad (5)$$

$$R_s = 1.25: \text{Basistrennung}$$

$$\alpha_{2,1} = \frac{k'_{2}}{k'_{1}} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (6)$$

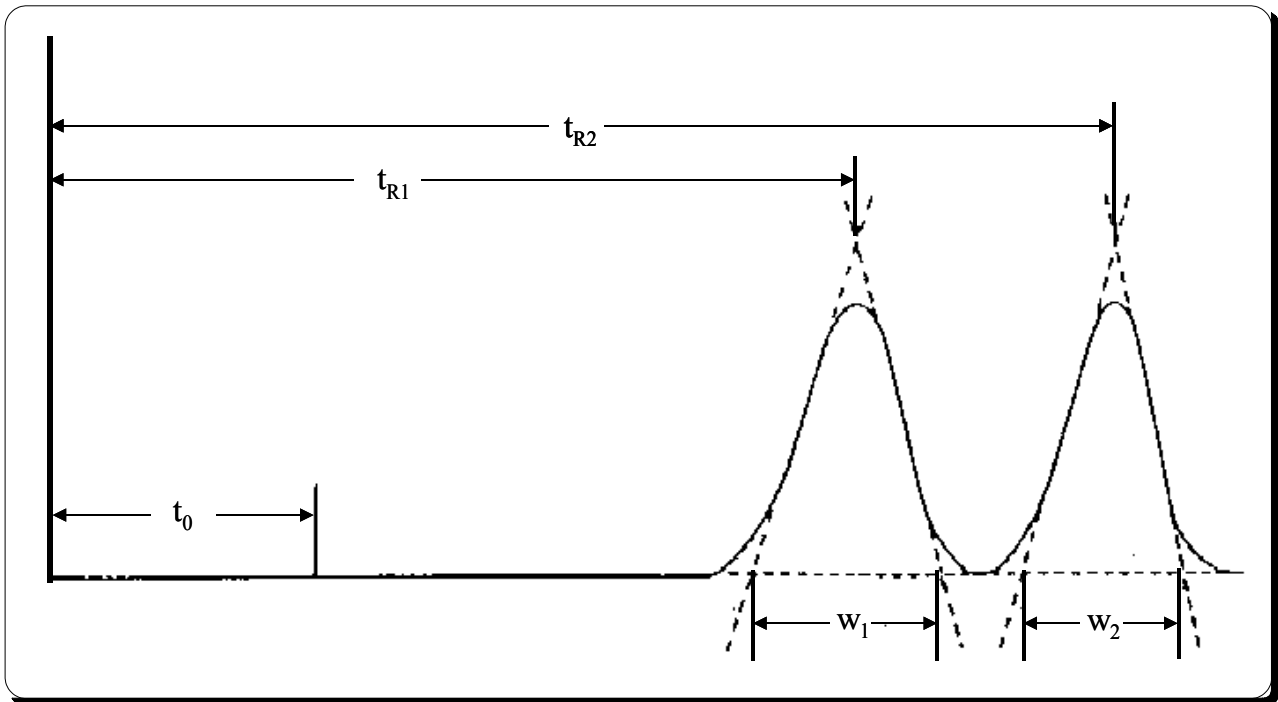
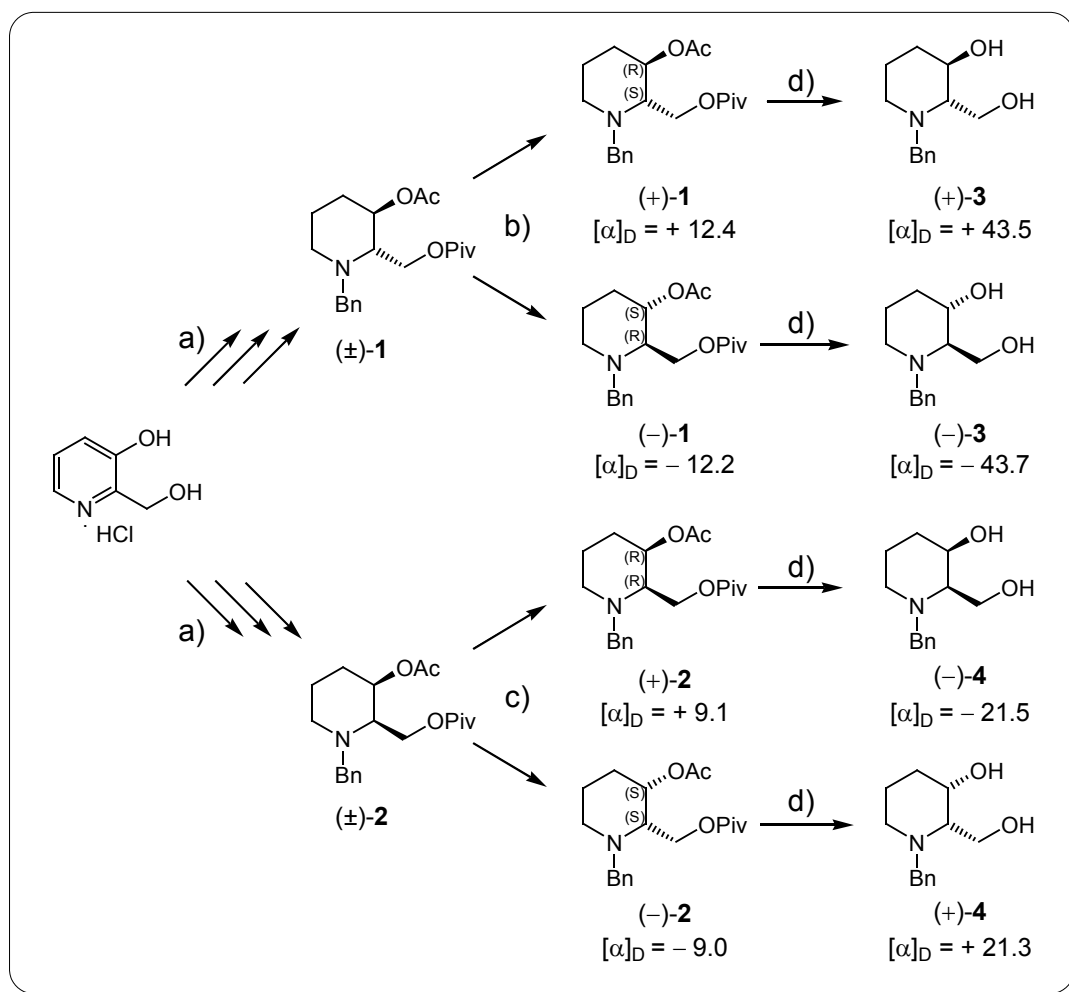


Abbildung 15: Kenngrößen zur Berechnung des Kapazitätsfaktors (k'), der Auflösung (R_s) und der Selektivität (α).

Die thermodynamischen Effekte können durch die Wahl der stationären und der mobilen Phase beeinflusst werden. Auch die Temperatur hat einen Einfluss auf die thermodynamischen Gleichgewichte. Im allgemeinen werden bei tiefen Temperaturen bessere Trennungen erhalten. Sie ist aber in den meisten Fällen nicht der entscheidende Faktor für eine Trennung. In der *reversed phase* HPLC kann man zusätzlich noch mit dem pH-Wert Einfluss auf die Thermodynamik nehmen.

5.2.2 HPLC-Trennung der *trans*- und *cis*-Diester



Schema 14: a) Synthese der Diester (*cis:trans* = 1:1) nach [2]; und Chromatographie (SiO_2 , Hexan/ AcOEt 87:13); b) präp. HPLC (*CHIRALCEL*[®] OD, Hexan/2-BuOH 200:1); c) präp. HPLC (*CHIRALCEL*[®] OD, Hexan/*i*-PrOH 100:1); d) KOH, EtOH/ H_2O , RT.

Die Synthese und säulenchromatographische Trennung der *cis*- und *trans*-Diester wurde analog zu [2][88] durchgeführt (siehe **Schema 14**). Das Ziel war, aufbauend auf der etablierten Synthese von FUREGATI, mit den Diestern eine Enantiomerentrennung mittels präparativer HPLC (*CHIRALCEL*[®] OD, 25 cm, 10 μm Partikel) zu erarbeiten. Dazu wurden die Diester mittels analytischer HPLC (*CHIRALCEL*[®] OD-H, 25 cm, 5 μm Partikel) auf ihre Trenneigenschaften untersucht. Die Trennung des *trans*-Diesters (±)-1 stellte sich als schwieriger heraus als erwartet.

Mit Hexan/EtOH-Laufmittelgemischen war auch bei starker Verdünnung des Alkohols und reduziertem Fluss keine Trennung mit der notwendigen Selektivität zu erreichen. Auch der Wechsel auf i-PrOH brachte nur begrenzt etwas. Bei sehr hoher Alkoholverdünnung (Hexan/i-PrOH 600:1) konnte eine Selektivität von $\alpha = 1.29$ und eine Auflösung von $R_S = 5.19$ erreicht werden, was theoretisch zur Trennung gereicht hätte. Doch mit k' -Werten von $k'_1 = 2.93$ und $k'_2 = 3.78$ war bereits auf der analytischen Säule ein beträchtliches *tailing* ($A_{S1} = 2.08$, $A_{S2} = 1.79$) der beiden Peaks festzustellen, welches sich beim Wechsel auf die präparative Säule (grössere Partikel, schlechtere Packung, geringere Drücke, längere Retentionszeiten) noch verstärkte und eine Trennung verunmöglichte. Zudem waren die Bodenzahlen mit $N_{1,theor.} = 4713$ und $N_{2,theor.} = 2118$ sehr tief. Aus diesem Grund wurden Trennversuche mit verschiedenen apolareren Alkoholen gemacht. Schlussendlich konnten mit dem Laufmittel Hexan/(±)-2-BuOH (200:1) und der Reduktion des Flusses auf 0.66 ml/min (Druck von 28 bar) auf der analytischen Säule die idealen Trennbedingungen gefunden werden (**Abbildung 16**). Das *tailing* konnte auf ein Minimum beschränkt werden ($A_{S1} = 1.20$, $A_{S2} = 1.54$). Auch die Bodenzahlen waren mit $N_{1,theor.} = 7634$, $N_{2,theor.} = 6786$ nun signifikant besser.

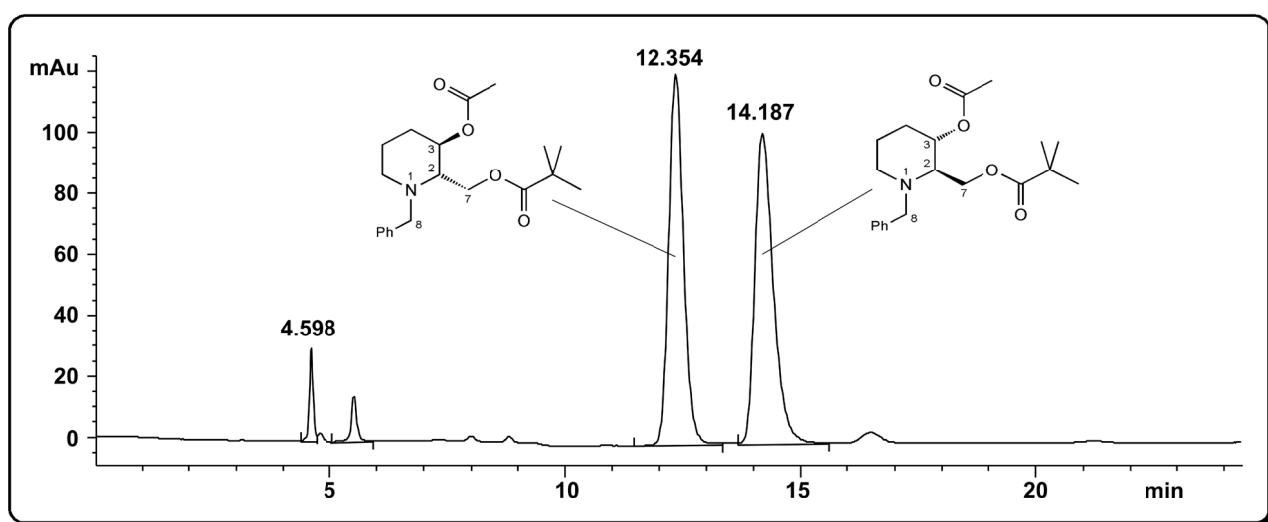


Abbildung 16: HPLC von (±)-**1** (CHIRALCEL® OD-H, Hexan/(±)-2-BuOH 200:1, 0.66 ml/min, 28 bar) mit $\alpha = 1.24$ und $R_S = 4.95$.

Für die präparative Trennung wurde dann allerdings der Alkoholgehalt im Laufmittelgemisch etwas erhöht (Hexan/2-BuOH 150:1), um die Retentionszeiten zu verkürzen, was wiederum das *tailing* bzw. *fronting* günstig beeinflusste. Die Trennung konnte mit einem Fluss von 6 ml/min (Druck: *ca.* 5 bar) realisiert werden. Das *tailing* bzw. *fronting* verhielt sich mit $A_{S1} = 0.8$ (leichtes *fronting*) und $A_{S2} = 2.1$ (*tailing*) günstig für eine präparative Trennung. Auch die Bodenzahlen ($N_{1,theor.} = 2920$, $N_{2,theor.} = 1710$) waren akzeptabel. Pro Einspritzung konnten so *ca.* 15 mg vom Enantiomerengemisch getrennt werden. Es wurden insgesamt 1.089 g (+)-**1** und 1.082 g (–)-**1** mit *ee* > 99% erhalten. In **Tabelle 3** (S. 53) ist eine Auswahl von HPLC Versuchen mit den *trans*-Diestern gezeigt.

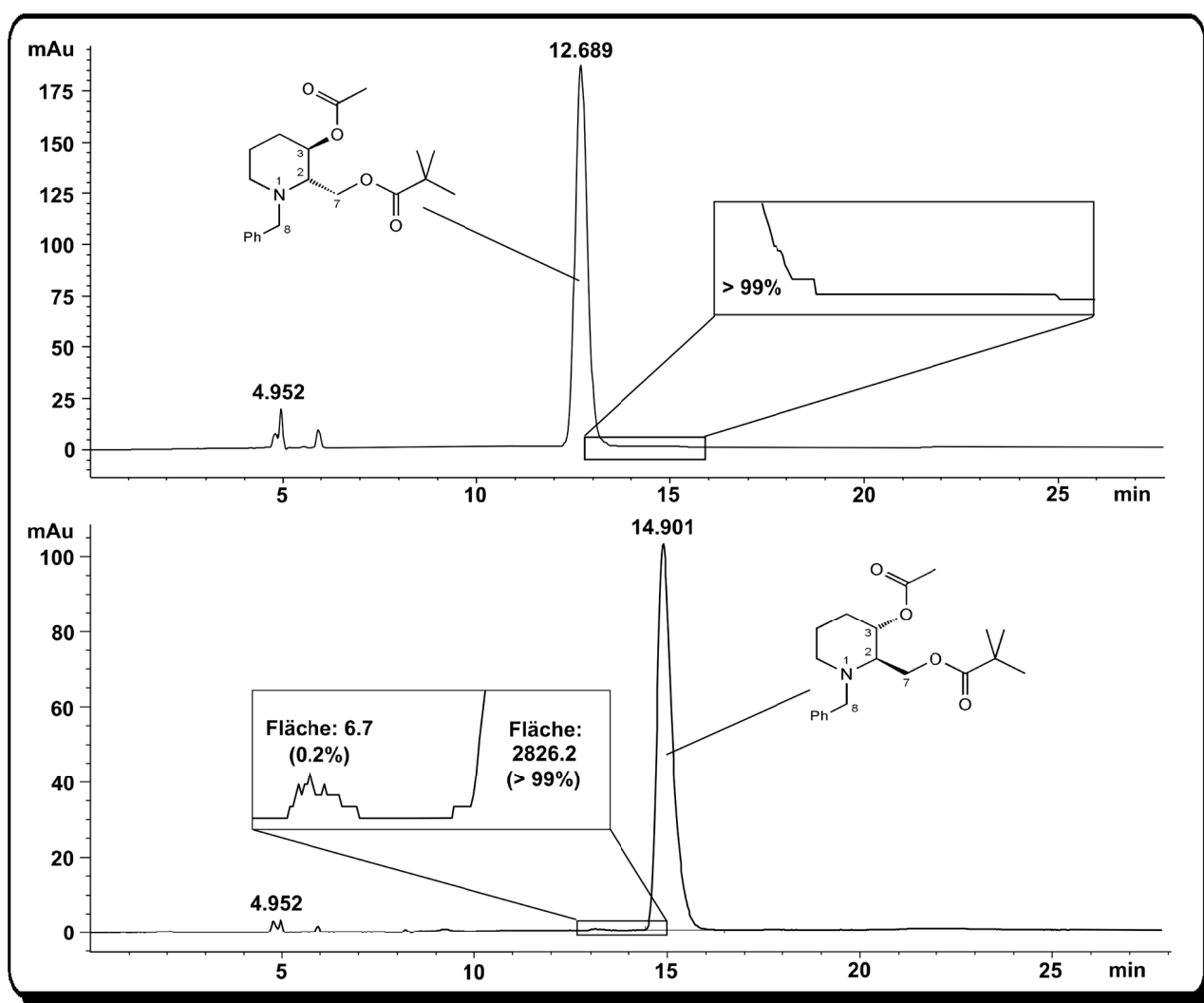


Abbildung 17: Bestimmung der *ee*-Werte von (+)-**1** und (–)-**1**. Beide optisch aktiven Verbindungen haben *ee* > 99%.

Die *ee*-Bestimmungen der getrennten Enantiomere ((+)-**1** und (–)-**1**) konnten aufgrund der guten Selektivität und der guten Auflösung der Trennung auf der analytischen Säule sehr genau durchgeführt werden. Es wurden jeweils *ee*-Werte von > 99% erreicht (**Abbildung 17**, S. 52). Die gut übereinstimmenden Drehwerte (im Betrag) der enantiomerenreinen Diester bestätigten diese Resultate.

Laufmittel	Fluss (1ml/min)	R_{t1} (min) / k'_1	R_{t2} (min) / k'_2	A_{S1}	A_{S2}	α	R_S
Hexan/EtOH 300:1	0.50	11.50 / 0.85	12.24 / 0.97	1.32	1.41	1.14	1.45
Hexan/EtOH 600:1	1.00	8.66 / 1.80	9.58 / 2.10	1.35	1.39	1.17	1.87
Hexan/i-PrOH 200:1	0.50	14.08 / 1.20	15.58 / 1.43	1.14	1.35	1.19	2.03
Hexan/i-PrOH 600:1	1.00	11.62 / 2.93	14.60 / 3.78	<u>2.08</u>	<u>1.79</u>	1.29	2.59
Hexan/2-BuOH 100:1	0.50	10.11 / 0.66	10.83 / 0.78	1.16	1.16	1.18	1.47
Hexan/2-BuOH 200:1	0.66	12.35 / 1.68	14.19 / 2.08	1.20	1.54	1.24	2.48

Tabelle 3: Eine repräsentative Auswahl von HPLC-Versuchen mit den *trans*-Diestern.

Die Trennung der *cis*-Diester war indes etwas einfacher, da schon mit Hexan/EtOH Gemischen vielversprechende Trennungen erzielt werden konnten. Um die Alkoholkonzentrationen im Laufmittelgemisch etwas erhöhen zu können, wurde von EtOH auf i-PrOH gewechselt. Mit der Reduktion des Flusses von 1 ml/min auf 0.5 ml/min und dem Laufmittelgemisch Hexan/i-PrOH (100:1) konnte schliesslich auf der analytischen HPLC-Säule eine ideale Trennung erreicht werden (siehe **Abbildung 18**, S. 54). Die Trennung war mit Bodenzahlen von $N_{1,theor.} = 12701$ und $N_{2,theor.} = 10389$, einer Selektivität von $\alpha = 1.36$ und einer Auflösung von 6.43 nahezu perfekt.

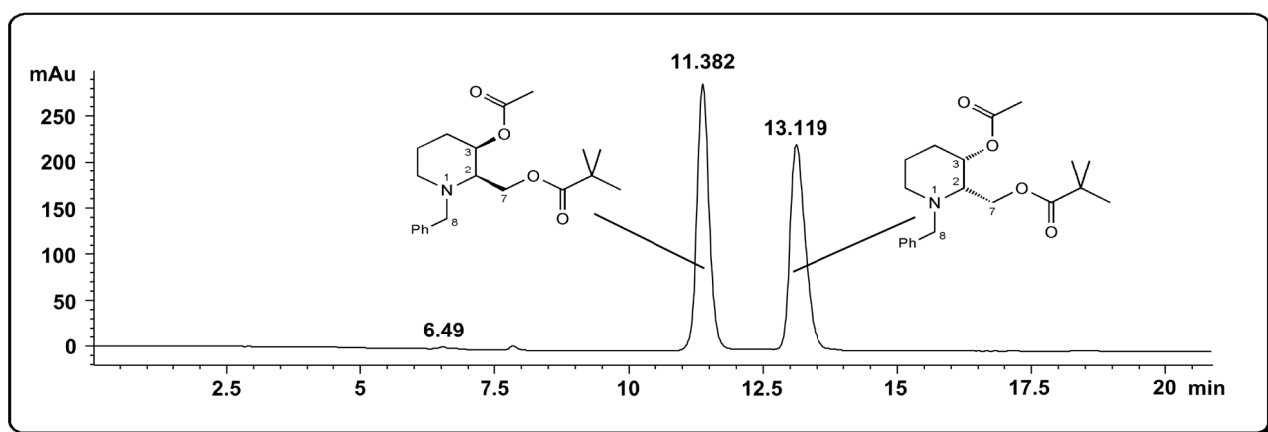


Abbildung 18: HPLC von (\pm) -**2** (CHIRALCEL[®] OD-H, Hexan/*i*-PrOH 100:1, 0.5 ml/min, 0.22 bar) mit $\alpha = 1.36$ und $R_S = 6.43$.

Die präparative Trennung konnte mit demselben Laufmittelgemisch bei einem Fluss von 6 ml/min (Druck: *ca.* 5 bar) durchgeführt werden. Pro Einspritzung konnten *ca.* 30 mg Enantiomerengemisch getrennt werden. Insgesamt wurden 1.471 g (+)-**2** und 1.447 g (-)-**2** mit *ee* > 99% erhalten.

Laufmittel	Fluss (1ml/min)	R_{t1} (min) / k'_1	R_{t2} (min) / k'_2	A_{S1}	A_{S2}	α	R_S
Hexan/EtOH 400:1	1.00	6.90 / 1.18	7.88 / 1.48	1.85	3.33	1.25	1.75
Hexan/EtOH 800:1	1.00	10.43 / 2.37	12.44 / 3.02	3.03	3.70	1.27	1.66
Hexan/ <i>i</i> -PrOH 600:1	1.00	13.16 / 3.12	18.67 / 4.85	1.92	3.13	1.55	3.91
Hexan/ <i>i</i> -PrOH 100:1	1.00	5.17 / 0.72	5.71 / 0.90	1.12	1.67	1.25	1.86
Hexan/<i>i</i>-PrOH 100:1	0.50	11.38 / 0.74	13.12 / 1.01	1.20	1.51	1.36	3.22

Tabelle 4: Eine repräsentative Auswahl von HPLC-Versuchen mit den *cis*-Diestern.

Auch in diesem Fall war die *ee*-Bestimmung dank der guten Selektivität und der hohen Auflösung der Trennung mit hoher Genauigkeit durchführbar. Es wurden jeweils *ee*-Werte von > 99% für die optisch aktiven Verbindungen bestimmt (vgl.

Abbildung 19). Untermauert wurde dieser Befund durch die gute Übereinstimmung der Drehwerte (im Betrag) der Enantiomeren (vgl. **Schema 14**, S. 50). Die **Tabelle 4** zeigt eine Auswahl von Trennversuchen mit den *cis*-Diestern.

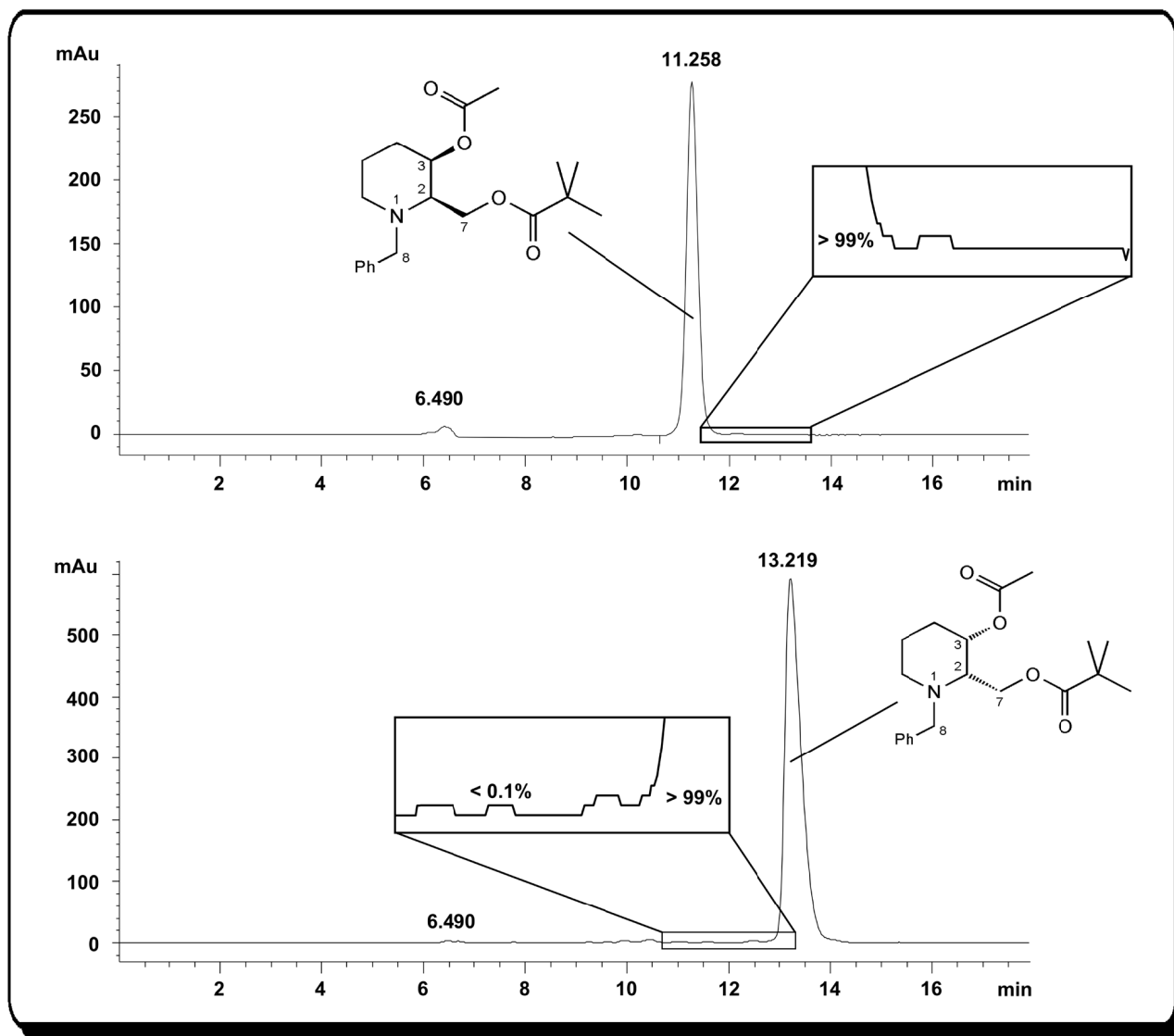


Abbildung 19: Bestimmung der ee-Werte von (+)-2 und (-)-2. Beide optisch aktiven Verbindungen haben ee > 99%.

Die Daten aus **Tabelle 4** verdeutlichen einmal mehr, dass eine gute Trennung auf der analytischen Säule noch keine Garantie dafür ist, dass mit diesen Bedingungen auch eine präparative Trennung möglich ist. Mit dem Laufmittelgemisch Hexan/i-PrOH (600:1) wird zwar eine hohe Selektivität und Auflösung erreicht, doch die hohen Retentionszeiten und das relativ starke *tailing* beider Peaks verunmöglichen eine

brauchbare präparative Trennung. Das vierte Beispiel in **Tabelle 4** zeigt – verglichen mit dem fünften Beispiel – welchen Einfluss der Fluss auf die Enantiomerentrennung haben kann. Der halbierte Fluss lässt mehr Zeit für die Bildung der diastereomeren Assoziate, was die Trennung erheblich verbessert.

Nach der HPLC-Trennung wurden die *trans*- und *cis*-Diester in EtOH mit wässriger KOH-Lsg. zu den entsprechenden optisch aktiven Diolen verseift. Die Reaktionen und die Aufarbeitungen konnten problemlos durchgeführt werden. Die *cis*-Diole wurden zur Reinigung in EtOH über Aktivkohle gekocht und anschliessend über eine "Minisäule" (3g SiO₂) mit AcOEt filtriert. Die zuerst gelblichen Verbindungen konnten so entfärbt werden. Nach Umkristallisation aus Et₂O durch Diffusion von Hexan konnten schöne, farblose Kristalle mit einem relativ scharfen Schmelzintervall erhalten werden. Bei den *trans*-Diolen reichte zur Reinigung das Filtrieren über eine "Minisäule" mit AcOEt. So erhielt man ein farbloses Öl, welches im Kühlschrank bei -20°C erstarrte. Auch hier konnten mittels Umkristallisation aus Et₂O durch Diffusion von Hexan farblose Kristalle erhalten werden. Es wurden jeweils Ausbeuten von > 80% erreicht.

Die Drehwerte der jeweiligen enantiomeren Diole stimmten im Betrag gut miteinander überein (vgl. **Schema 14**, S. 50). Interessanterweise ändert sich das Vorzeichen durch die Verseifung der *cis*-Diester: (–)-**2** wird zu (+)-**4** und (+)-**2** wird zu (–)-**4**.

5.3 Bestimmung der absoluten Konfiguration der Diole

In ersten Vorversuchen wurden 4-Brombenzoyldiester synthetisiert, welche durch Röntgenkristallstrukturanalyse die absolute Konfiguration der Diole hätten liefern sollen. Die Herstellung der Verbindungen wurde in CH₂Cl₂ mit 4-Brombenzoylchlorid, NEt₃ und DMAP bei RT durchgeführt. Es wurden mit > 80% gute Ausbeuten erzielt. Die eher schlechten Kristallisationseigenschaften der Verbindungen liessen keinen schnellen Informationsgewinn zu, weshalb die Idee

verworfen wurde.

Stattdessen wurden die Diole mit $(-)$ -(*R*)- resp. $(+)$ -(*S*)- α -Methyl- α -trifluoromethylphenyllessigsäurechlorid (MTPA-Cl) zu den entsprechenden (*S*)- resp. (*R*)-MTPA-Diestern derivatisiert²⁴. Diese chirale Hilfsgruppe ist besser bekannt unter dem Namen "MOSHER's Reagenz" oder "MOSHER's Säure(chlorid)". Durch die Derivatisierung werden diastereoisomere Verbindungen mit unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften gebildet. Mit der nach ihm benannten, empirisch abgeleiteten Methode [66] für sekundäre Alkohole und primäre Amine bestimmte MOSHER anhand der unterschiedlichen ^{19}F -chemischen Verschiebungen der diastereoisomeren CF_3 -Gruppen die absoluten Konfigurationen [89]. Er verglich die ^{19}F -chemischen Verschiebungen seiner enantiomeren Verbindungen mit denjenigen von "MOSHER-Derivaten" mit bekannten absolute Konfigurationen.

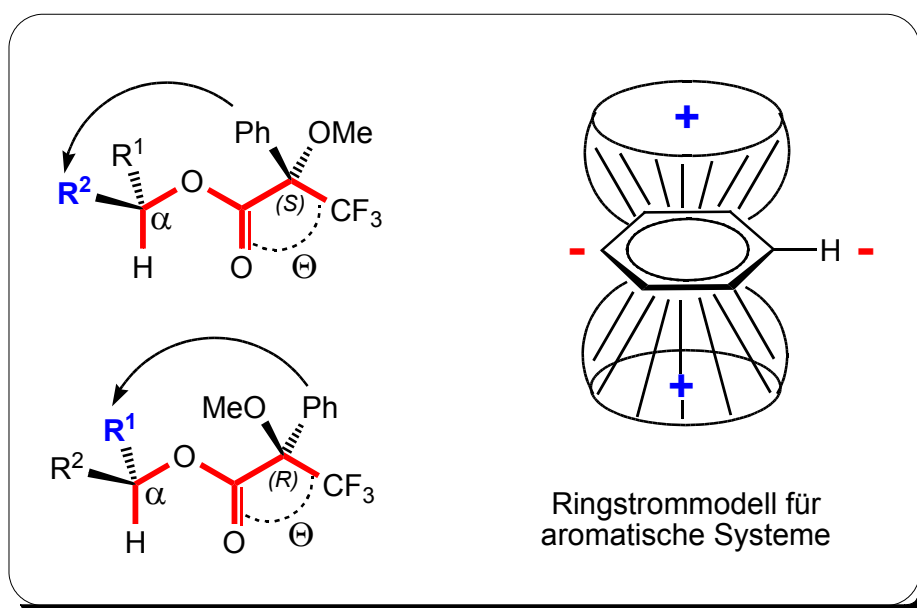


Abbildung 20: Links: Von MOSHER vorgeschlagene Konformationen als Idealfall mit $\Theta \approx 0^\circ$ (in rot). Die Pfeile stellen den Einfluss des diamagnetischen Ringstroms auf die Protonen an R^1 bzw. R^2 (in blau) dar. Rechts: In der positiven Zone über und unter dem Ring werden die Protonen abgeschirmt und in der negativen Zone in der Ebene des Rings entschirmt.

²⁴ Bei der Verwendung der MTPA-Chloride für die Derivatisierung ändern sich die Prioritäten. Aus dem (*S*)-MTPA-Cl wird der (*R*)-MTPA-Diester, und aus dem (*R*)-MTPA-Cl wird der (*S*)-MTPA-Diester.

Die ^{19}F -NMR-Methode stellte sich jedoch als nicht sehr zuverlässig heraus, weshalb man sie durch Änderung der Argumentation modifizierte [90][91]. Man konnte durch den Einsatz von Hochfeld ^1H -NMR Spektroskopie feststellen, dass die Protonen an R^1 resp. R^2 in den entsprechenden MTPA-Derivaten hochfeld- bzw. tieffeldverschoben waren. Aufgrund des „diamagnetischen“ Ringstroms der Phenylgruppe im "Mosher Reagenz" und der damit verbundenen starken magnetischen Anisotropie werden die Protonen an R^2 im (*S*)-MTPA-Ester (R^1 im (*R*)-MTPA-Ester) hochfeldverschoben, wohingegen die gleichen Protonen (an R^2) im (*R*)-MTPA-Ester im Vergleich dazu tieffeldverschoben sind (vgl. **Abbildung 20**, S. 57). Aus den Differenzen (in ppm oder Hz) dieser Verschiebungen kann auf die absolute Konfiguration der Verbindungen geschlossen werden (siehe **Gleichung 7**). Für den in **Abbildung 20** gezeigten Fall sollten die $\Delta\delta$ -Werte für die Protonen an $\text{R}^2 < 0$ und für die Protonen an $\text{R}^1 > 0$ sein.

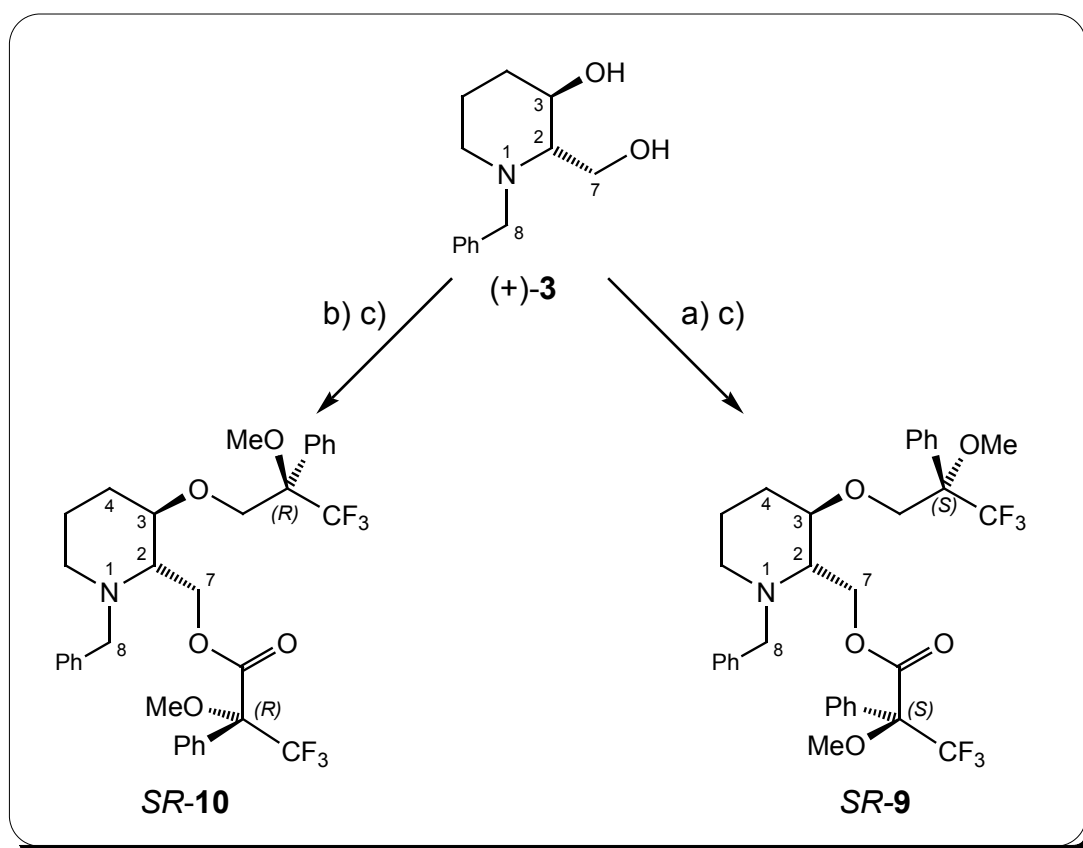
$$\Delta\delta = \delta_S - \delta_R \quad (7)$$

Damit aber diese Schlussfolgerungen gemacht werden können, muss die in **Abbildung 20** (S. 57) rot eingefärbte und von Mosher postulierte Konformation ("Mosher-Konformation") vorliegen [92]. Dabei liegt das α -H des zu bestimmenden Alkohols oder Amins mit der MTPA-Carbonyl- und der MTPA-Trifluoromethylgruppe in einer Ebene (MTPA-Ebene). In [93] wurde durch Berechnungen gezeigt, dass die "Mosher -Konformation" nur eine von zwei stabilen Konformationen ist. Bei der anderen Konformation liegt die CF_3 -Gruppe anti ($\Theta \approx 180^\circ$) zur Carbonylfunktion. Doch IR-Untersuchungen [93] und Röntgenstrukturanalysen [94][95] haben wiederum dargelegt, dass die von Mosher vorgeschlagene Konformation ($\Theta \approx 0^\circ$) gegenüber der anderen Konformation ($\Theta \approx 180^\circ$) bevorzugt ist (7:3).

Im ^1H -NMR Spektrum kann man leicht abschätzen, ob eine "Mosher-Konformation" vorliegt, indem man die chemische Verschiebung des α -H-Atoms betrachtet. Liegt

die gewünschte "Mosher-Konformation" vor, sollte die chemische Verschiebung des α -H-Atoms in beiden Diastereoisomeren in etwa gleich sein, da es in der MTPA-Ebene liegt und daher in beiden Fällen den gleichen diamagnetischen Effekt der Phenylgruppe spürt (vgl. auch **Abbildung 20**).

Die sterischen Einflüsse der Substituenten R^1 und R^2 sind massgeblich für das Gelingen der Methode verantwortlich. Im Idealfall sollte der Betrag der Verschiebungsdifferenz $|\Delta\delta|$ mit zunehmendem Abstand zum Phenylring abnehmen. Ist dies der Fall, so ist das ein weiterer Hinweis für die Verlässlichkeit der Methode. Sollte die Verschiebungsdifferenz $\Delta\delta$ nicht direkt proportional zum Abstand oder sogar inhomogen betreffend Vorzeichen sein, so wäre eine Interpretation nach der Theorie nicht möglich, da keine "Mosher-Konformation" vorliegt [90].



Schema 15: Synthese der trans-Mosher-Derivate: a) In CH_2Cl_2 mit Et_3N , kat. DMAP und (–)-(R)-MTPA-Cl; b) In CH_2Cl_2 mit Et_3N , kat. DMAP und (–)-(S)-MTPA-Cl; c) Chromatographie (SiO_2 , Et_2O /Hexan 9:1).

Für die Synthese der MTPA-Derivate in der vorliegenden Arbeit wurde von den *trans*- sowie den *cis*-Diolen jeweils nur ein Enantiomer verwendet und mit (–)-(R)- und (+)-(S)-MTPA-Cl umgesetzt (siehe).

Das *trans*-Diol (+)-**3** wurde in CH₂Cl₂ mit Et₃N, DMAP und (–)-(R)- bzw. (+)-(S)-MTPA-Cl zu den Diestern *SR*-**9**²⁵ und *SR*-**10**²⁵ umgesetzt. Nach einer Stunde war die Reaktion vollständig abgelaufen und es konnte aufgearbeitet und gereinigt werden. Es wurden Ausbeuten von > 90% erreicht.

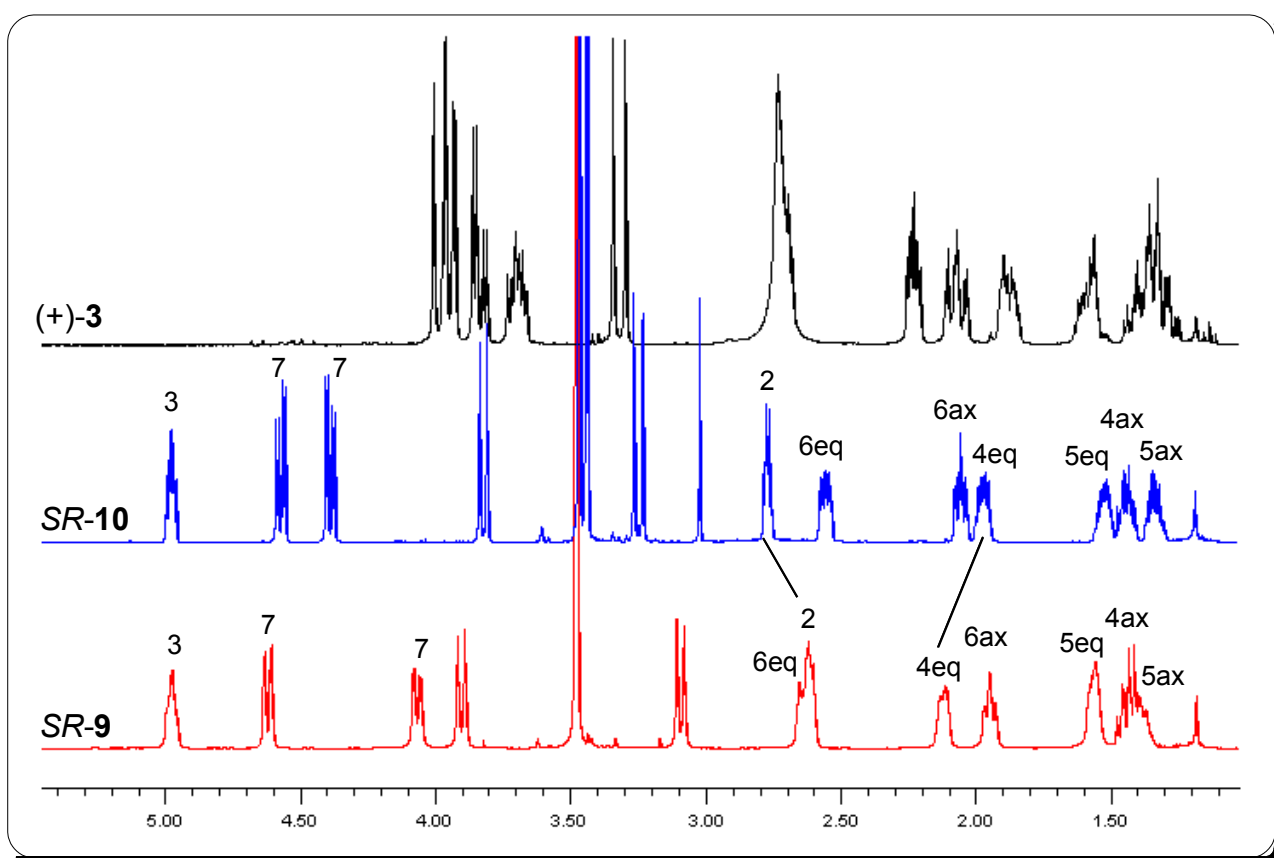


Abbildung 21: ¹H-NMR Spektren der *trans*-MOSHER-Derivate und des Diols (+)-**3** im Vergleich.

Es wurden COSY-Spektren der Derivate zur genauen Zuordnung der Signale aufgenommen. In **Abbildung 21** sind die ¹H-NMR Spektren der *trans*-Di-MTPA-Derivate einander gegenübergestellt. Zuallererst ist festzustellen, dass das α-H-Atom

²⁵ Das *SR* in *SR*-**9** und *SR*-**10** bezeichnet die absoluten Konfigurationen an C(2) und C(3) im MOSHER-Derivat. Diese abgekürzte, nomenklatorisch nicht korrekte Form der Bezeichnung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit für alle MOSHER-Verbindungen in der vorliegenden Arbeit gewählt. Die absoluten Konfigurationen der MOSHER-Ester können aus den dazugehörigen Schemata und Abbildungen entnommen werden.

(H-C(3)) in beiden Derivaten die gleiche chemische Verschiebung aufweist ($\Delta\delta = 0$), was auf die Existenz der "MOSHER-Konformation" schliessen lässt. Die wichtigsten Signale bei der Betrachtung der $\Delta\delta$ -Werte sind die Protonen H-C(2) und H₂C-(4). Es ist im Spektrum auch ohne Berechnung der $\Delta\delta$ -Werte ganz deutlich zu sehen, dass in *SR-9* H-C(2) hochfeld- und H_{eq}-C(4) tieffeld-verschoben ist, während in *SR-10* H-C(2) tieffeld- und H_{eq}-C(4) hochfeld-verschoben ist. Genau dieses Resultat erwartet man im Idealfall. Der $\Delta\delta$ -Wert des Wasserstoffs an C(2) ist negativ und der von H_{eq}-C(4) ist positiv (siehe *Tabelle 5*).

Derivat		H-Atome	δ_S	δ_R	$\Delta\delta$
<i>SR-9</i> ((<i>S</i>)-MTPA)	<i>SR-10</i> ((<i>R</i>)-MTPA)	H-C(2)	2.69	2.85	− 0.16
		H _A -C(7)	4.70	4.65	+ 0.05
		H _B -C(7)	4.14	4.46	− 0.31
		H _{eq} -C(4)	2.20	2.05	+ 0.15
		H _{ax} -C(4)	~ 1.51	1.51	0
		H _{eq} -C(5)	1.64	1.60	+ 0.04
		H _{ax} -C(5)	~ 1.47	1.41	+ 0.06
		H _{eq} -C(6)	2.72	2.63	+ 0.09
		H _{ax} -C(6)	2.03	2.13	− 0.10

Tabelle 5: $\Delta\delta$ -Werte für die trans-Di-MOSHER-Derivate.

Das H_{ax}-C(4) entzieht sich in beiden Derivaten scheinbar dem Einfluss des Phenylrings und zeigt keinerlei Veränderung von Derivat zu Derivat. Die Wasserstoffe an C(5) haben erwartungsgemäss kleinere positive $\Delta\delta$ -Werte. Die Wasserstoffe an C(7) hingegen zeigen eine leichte Inhomogenität der Vorzeichen. Man würde für beide Protonen negative $\Delta\delta$ -Werte erwarten. H_A zeigt jedoch einen schwach positiven Wert, und H_B zeigt einen enorm stark negativen Wert. Dieser Befund ist zu erklären, wenn die "MOSHER-Seitenketten" in der in *Abbildung 22* gezeigten Konformation vorliegen. In *SR-9* wird H_B vom diamagnetischen Ringstrom

der Phenylringe beider "Mosher-Seitenketten" beeinflusst, was den stark negativen $\Delta\delta$ -Wert erklärt. In *SR-10* hingegen wird H_A nur vom Phenylring der primären "Mosher-Seitenkette" beeinflusst, was den schwach positiven $\Delta\delta$ -Wert für diesen Wasserstoff erklärt (siehe blaue Pfeile in *Abbildung 22*).

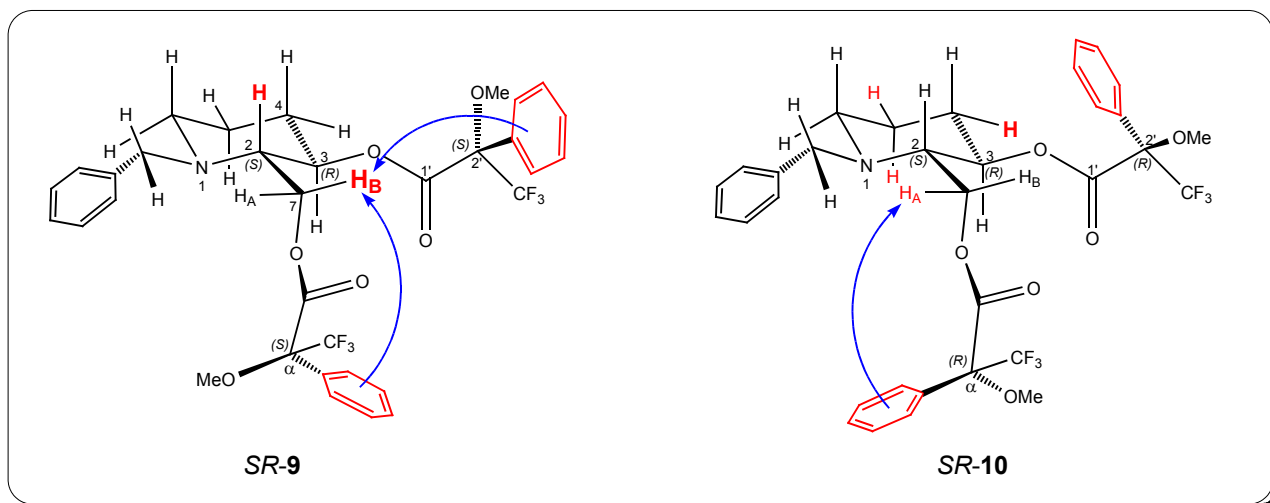


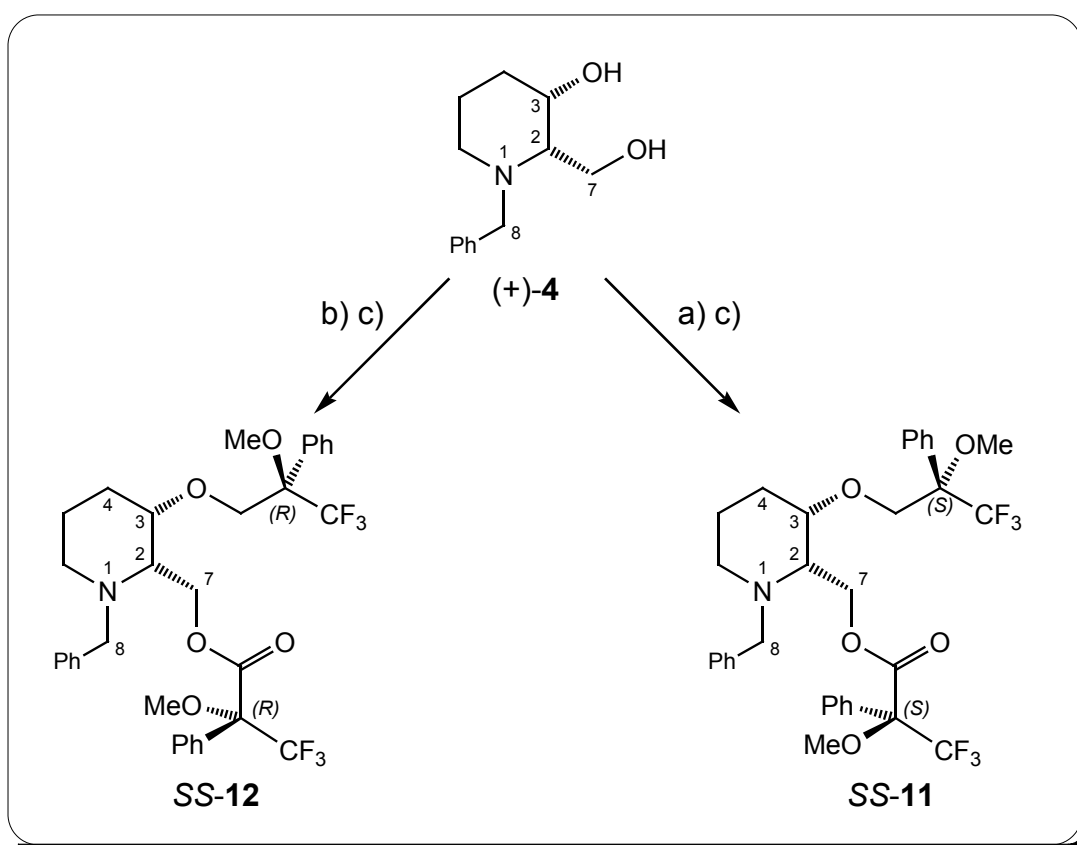
Abbildung 22: Modelle der beiden trans-MOSHER-Derivate. Die rot eingefärbten H's stehen unter dem Einfluss des diamagnetischen Ringstroms. Je grösser die H's gezeichnet sind, desto stärker werden sie beeinflusst. H_B in *SR-9* wird am stärksten von den diamagnetischen Effekten beeinflusst.

Dass sich die Signale der Wasserstoffe an C(6) in der Art verschieben, wie das in *Tabelle 5* angedeutet wird, ist hingegen eher schwer zu erklären. Nach der Theorie, welche für Mono-MTPA-Derivate ausgearbeitet wurde, müssten die Wasserstoffe an C(6) in der MTPA-Ebene liegen, wenn eine Sessel-Konformation vorliegt. Da es sich hier jedoch um ein Di-MTPA-Derivat handelt und die MTPA-Seitenketten sterisch relativ anspruchsvoll sind, kann es durchaus sein, dass die Sessel-Konformation in eine *Twist-Boat*-Konformation umklappt, um die sterische Hinderung zu minimieren. Dies sind jedoch nur Spekulationen, welche aufgrund der flexiblen und komplexen Struktur des Moleküls nicht ohne weitere Analysen erhärtet werden können. Die Aussagekraft der Messungen wird durch diese Erklärungslücke jedoch in keinsten Weise geschmälert, denn die wichtigsten NMR-Signale verhalten sich der Theorie entsprechend, was eine eindeutige Bestimmung der absoluten Konfiguration zulässt.

Die errechneten $\Delta\delta$ -Werte konnten mit den in **Abbildung 22** gezeigten Modellen erklärt werden, was zur Schlussfolgerung führte, dass (+)-**3** die (2*S*,3*R*)- und (-)-**3** die (2*R*,3*S*)-Konfiguration hat. Diese Schlussfolgerung wurde später durch die Kristallstruktur von (-)-**5ax** (siehe S. 239) bestätigt.

Das *cis*-Diol (+)-**4** wurde analog zu (+)-**3** in CH₂Cl₂ mit Et₃N, DMAP und (-)-(R)- bzw. (+)-(S)-MTPA-Cl zu den Diestern **SS-11** und **SS-12** umgesetzt. Es wurden Ausbeuten von jeweils > 95% erreicht.

Auch hier wurden COSY-Spektren für die genaue Zuordnung der NMR-Signale aufgenommen.



Schema 16: Synthese der *cis*-MOSHER-Derivate: a) In CH₂Cl₂ mit Et₃N, kat. DMAP und (-)-(R)-MTPA-Cl; b) In CH₂Cl₂ mit Et₃N, kat. DMAP und (-)-(S)-MTPA-Cl; c) Chromatographie (SiO₂, Et₂O/Hexan 9:1).

In **Abbildung 23** (S. 64) sind die ¹H-NMR Spektren der *cis*-Di-MTPA-Ester einander gegenüber gestellt. Beim ersten Blick fällt sofort auf, dass sich die chemische

Verschiebung des α -H-Atoms an C(3) von Derivat zu Derivat verändert. Dies lässt den Schluss zu, dass H-C(3) nicht in der MTPA-Ebene liegt und demzufolge auch keine "MOSHER-Konformation" vorliegt. Dieser Befund schmälerte natürlich die Aussagekraft der Messungen enorm, obwohl man im Nachhinein – nachdem man die abs. Konfiguration aus anderen Experimenten kennt – eine durchaus sinnvolle Interpretation der Messresulate machen kann. Trotzdem wird diese Interpretation an dieser Stelle dargelegt, obwohl es nicht der Chronologie der Ereignisse entspricht.

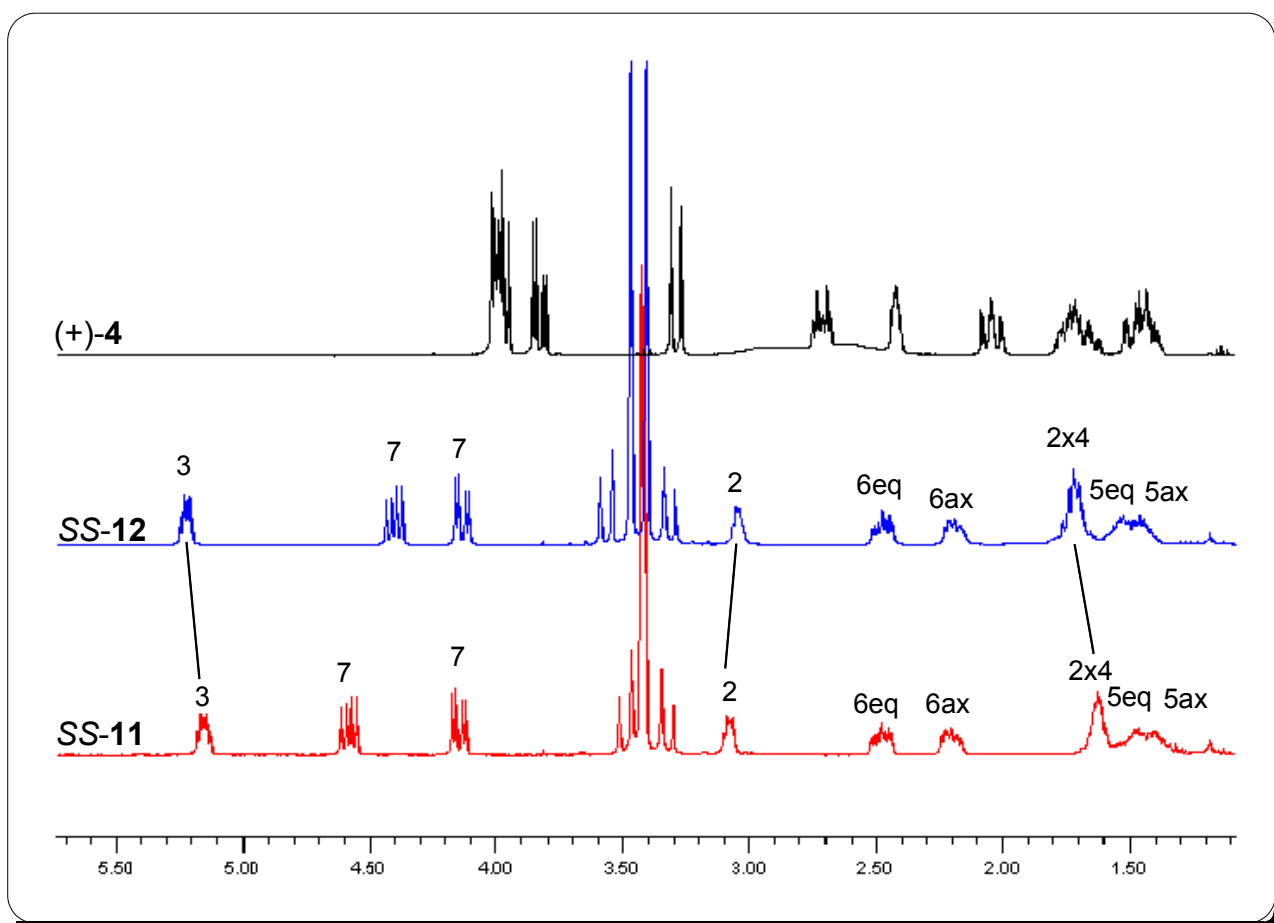


Abbildung 23: ^1H -NMR Spektren der cis-MOSHER-Derivate und des Diols (+)-4 im Vergleich.

Die Signale der Wasserstoffe an C(2) und C(4) verschieben sich von Derivat zu Derivat grundsätzlich so, wie man es nach der Theorie erwartet. In SS-11 ist das H-C(2) leicht tieffeld-verschoben im Vergleich zu SS-12. Umgekehrt verhält es sich mit den Signalen der Wasserstoffe $\text{H}_2\text{-C}(4)$. In SS-11 sind beide leicht hochfeld-

verschoben im Vergleich zu *SS-12*. Alleine diese Betrachtung hätte ausgereicht, um die abs. Konfiguration zu bestimmen. Doch die Unsicherheit aufgrund der Signale des H-Atoms an C(3) wurde für eine verlässliche Aussage als zu gross empfunden.

Wenn man die $\Delta\delta$ -Werte in **Tabelle 6** studiert, kommt man allerdings zum Schluss, dass diese – bis auf die Signale des H-C(3) – sogar eindeutiger sind als jene der *trans*-Di-MTPA-Ester. Die Vorzeichen sind der Theorie gemäss homogen verteilt, und der Betrag der Verschiebungsdifferenz $|\Delta\delta|$ nimmt direkt proportional mit dem Abstand zum Phenylring ab.

Derivat		H-Atome	δ_s	δ_R	$\Delta\delta$
SS-11 ((S)-MTPA)	SS-12 ((R)-MTPA)	H-C(2)	3.21	3.17	+ 0.04
		H _A -C(7)	4.70	4.65	+ 0.17
		H _B -C(7)	4.14	4.46	+ 0.01
		H-C(3)	5.23	5.30	– 0.07
		H ₂ -C(4)	1.71	1.80	– 0.09
		H ₂ -C(5)	1.52	1.58	– 0.06
		H _{eq} -C(6)	2.56	2.56	0
		H _{ax} -C(6)	2.32	2.31	+ 0.01

Tabelle 6: $\Delta\delta$ -Werte für die *cis*-Di-MOSHER-Derivate.

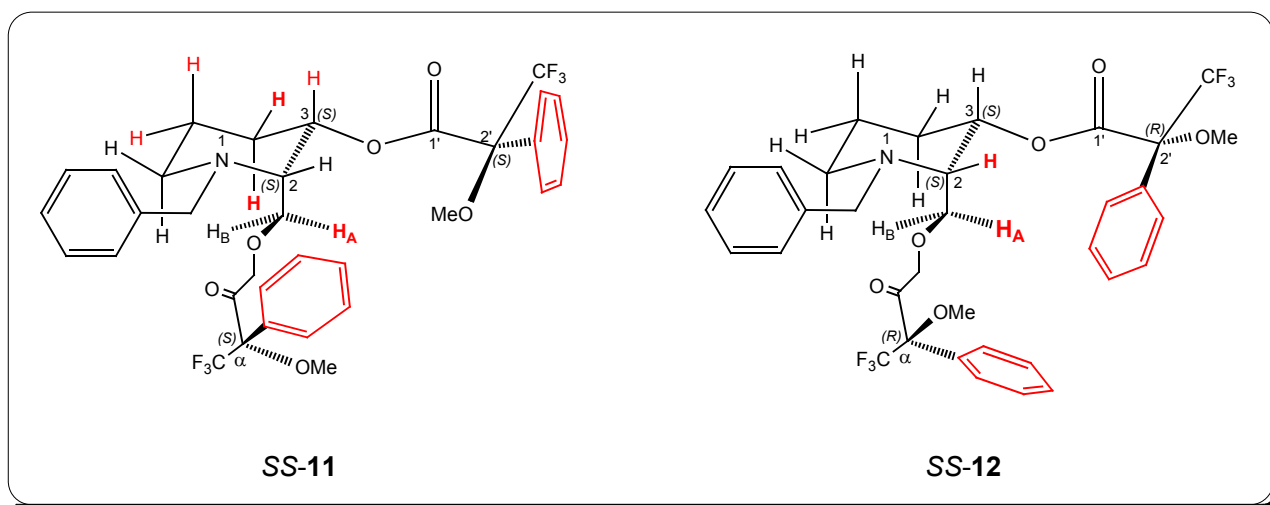
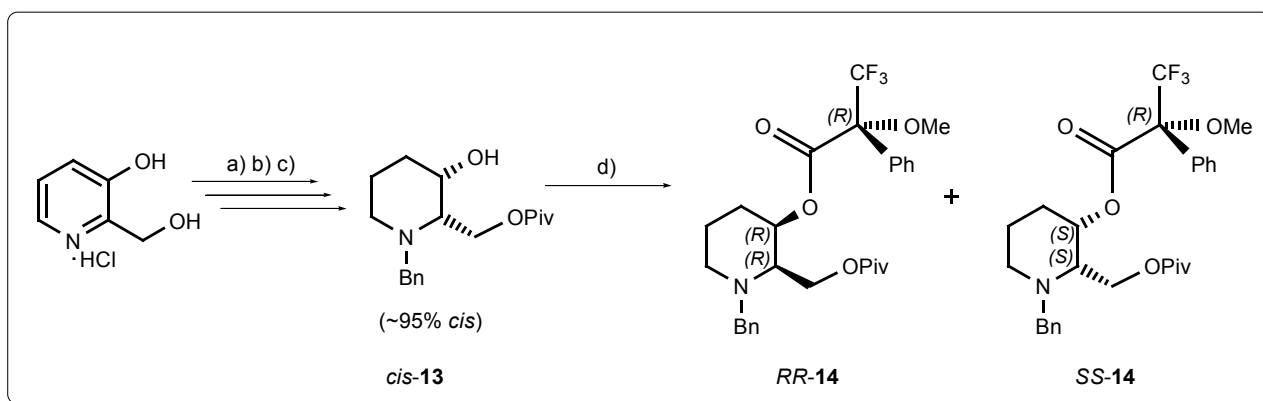


Abbildung 24: Modelle der *cis*-Di-MTPA-Derivate.

Aufgrund von Modellbetrachtungen ist anzunehmen, dass die "MOSHER-Konformation" durch die grosse sterische Abstossung der beiden "MOSHER-Seitenketten" zwar verhindert wird, die Konformation aber nur so wenig vom Idealfall abweicht, dass sich doch eine verlässliche Interpretation machen lässt. So kann man aus Daten aus den ^1H -NMR Spektren die in **Abbildung 24** dargestellten Modelle erstellen und die abs. Konfiguration von (+)-**4** und in Analogie dazu auch diejenige von (–)-**4** bestimmen. Für (+)-**4** wurde die (2*S*,3*S*)- und für (–)-**4** die (2*R*,3*R*)-Konfiguration bestimmt.

Wie schon oben erwähnt, wurden aufgrund der Unsicherheit in Bezug auf die mit der Theorie nicht übereinstimmenden $\Delta\delta$ -Werte von H-C(3) (α -H) in *SS-11* bzw. *SS-12*, andere Experimente zur Bestimmung der abs. Konfiguration von (+)-**4** und (–)-**4** durchgeführt. Eines dieser Experimente war die Synthese von *cis*-Mono-MTPA-Derivaten, wie in **Schema 17** dargestellt.



Schema 17: Synthese der *cis*-Mono-MTPA-Derivate: a) H_2O ($\text{pH} = 3$), H_2 (60 bar), *Rh* (5% auf Al_2O_3), 18h, 35°C ; b) $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$, Na_2CO_3 , BnBr , $\uparrow\downarrow$; c) Pyridin, 1 Äq. Pivalinsäurechlorid, -20°C ; d) CH_2Cl_2 , Et_3N , kat. DMAP und (–)-(S)-MTPA-Cl, RT.

Ausgehend von 2-(hydroxymethyl)-pyridin-3-ol · HCl wurden die MOSHER-Derivate *RR-14* und *SS-14* synthetisiert. Die Synthese konnte mit guten Ausbeuten durchgeführt werden, und das erhaltene Diastereoisomerengemisch *RR-14/SS-14* konnte mittels HPLC (CHIRALCEL OD[®]) aufgetrennt werden (siehe **Abbildung 25**, S. 67). Dabei wurde bei der Trennung nicht auf Diastereoisomerenreinheit geachtet,

sondern die Verbindungen mit $de > 80\%$ nur angereichert. Die Trennung ist mit $\alpha = 1.16$ und $R_s = 1.16$ nicht sonderlich gut, doch genügend, um eine Anreicherung zu erzielen. Für genauere NMR-Untersuchungen wurden die Diastereoisomere mittels HPLC (CHIRALCEL OD[®]) jedoch nochmals gereinigt, und es wurden de -Werte $> 95\%$ erreicht.

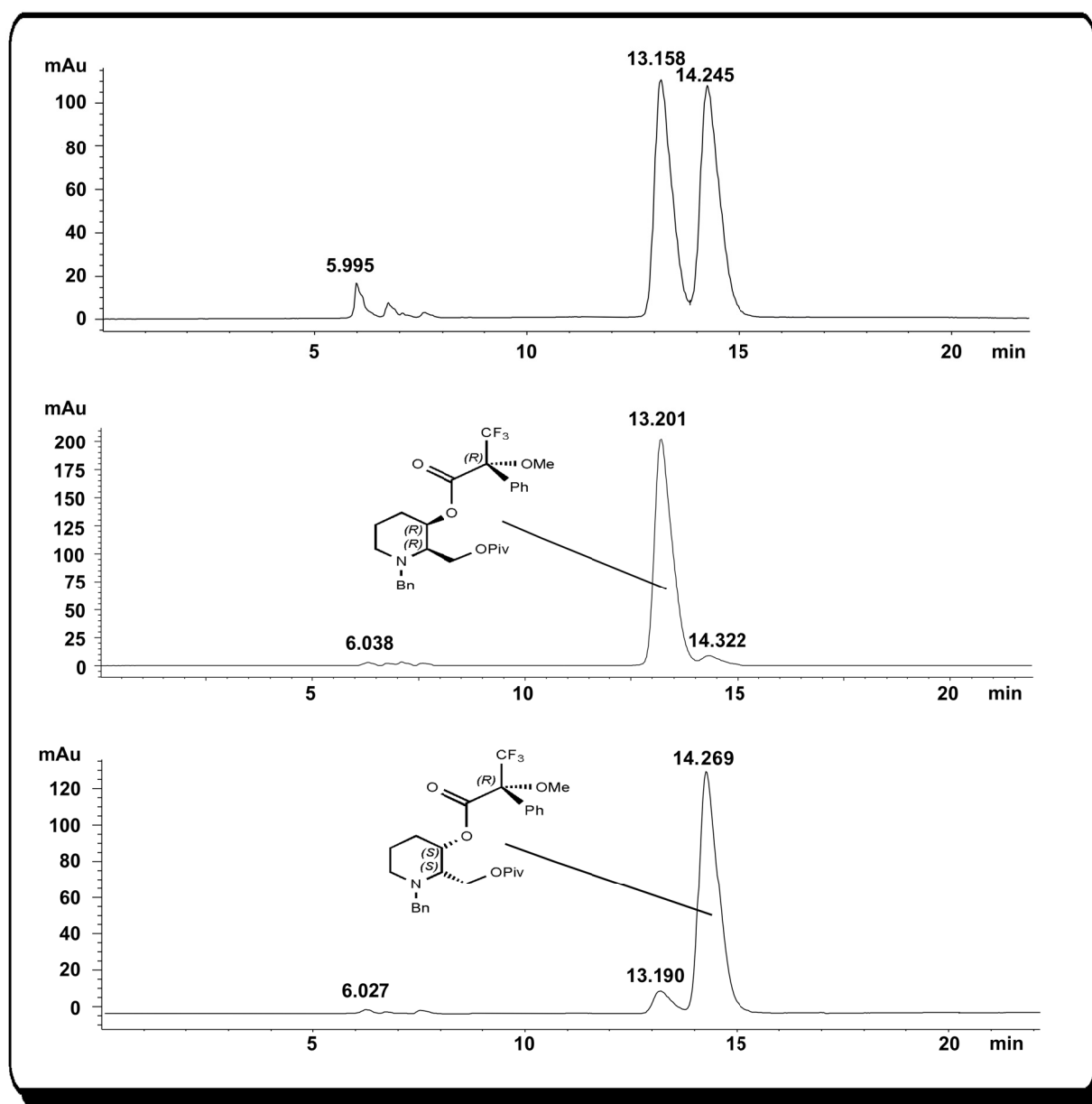


Abbildung 25: Anreicherung der *cis*-Mono-MTPA-Derivate mittels HPLC (CHIRALCEL OD[®], Hexan/*i*-PrOH 150:1, 0.5 ml/min, 0.22 bar). RR-14 mit $de = 90\%$ und SS-14 mit $de = 83\%$.

Zur genauen Zuordnung der NMR-Signale wurden COSY-Spektren aufgenommen. Wenn man die ^1H -NMR Spektren der beiden Mono-MTPA-Derivate vergleicht, sieht man von Auge keine signifikante Verschiebungsdifferenz des α -H's (siehe **Abbildung 26**). Beim Vergrössern des Spektrenauschnitts erkennt man allerdings, dass das Signal von H-C(3) in *RR*-**14** um 0.02 ppm hochfeld-verschoben ist gegenüber demjenigen in *SS*-**14**.

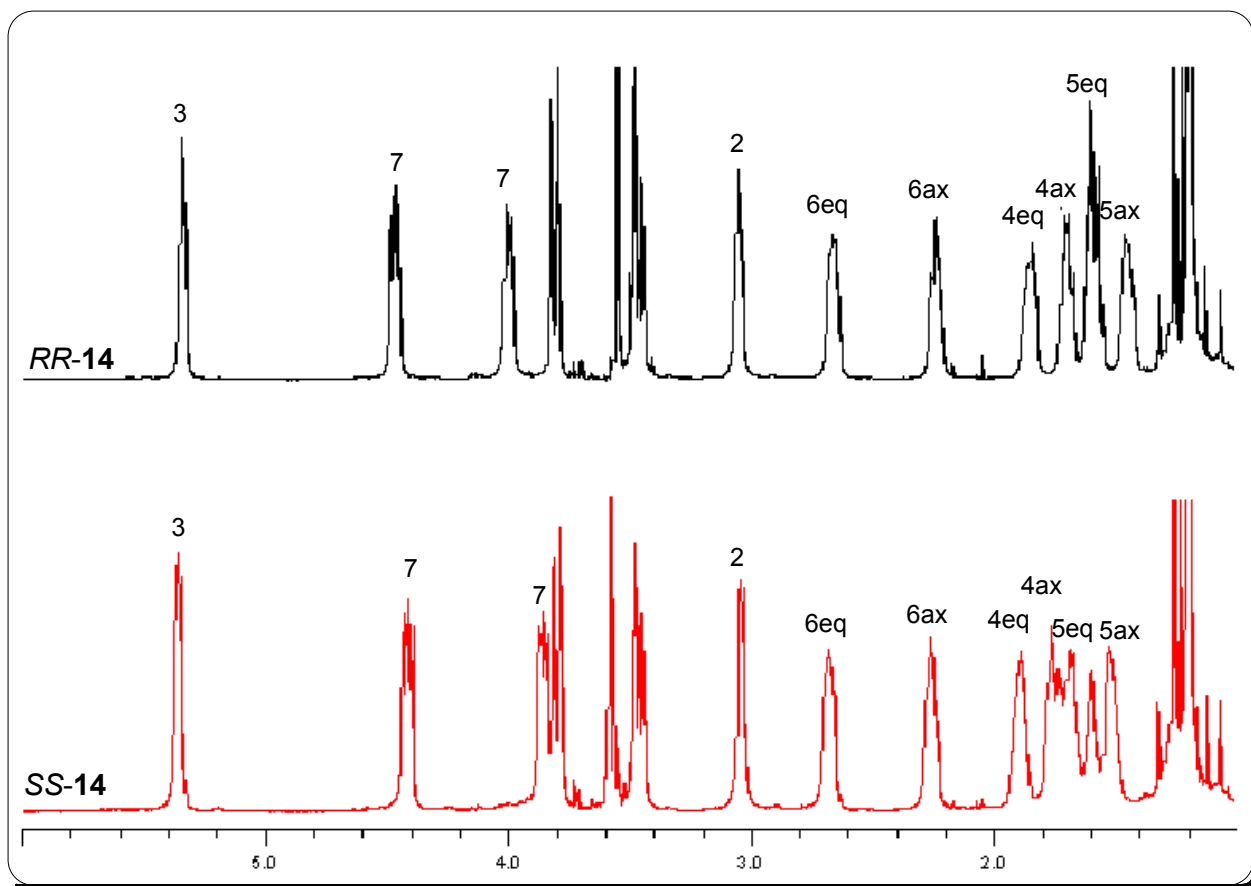


Abbildung 26: ^1H -NMR Spektren der *cis*-Mono-MTPA-Derivate *RR*-**14** und *SS*-**14**.

Trotz dieser kleinen Diskrepanz konnte eine überzeugende Interpretation der NMR-Daten durchgeführt werden. Man konzentrierte sich dabei vor allem auf die chemischen Verschiebungen der wichtigsten Wasserstoffe an C(2) (**Abbildung 27**) und an C(4) (**Abbildung 28**). Man konnte so die absolute Konfiguration von *RR*-**14** als (2*R*,3*R*) und die von *SS*-**14** als (2*S*,3*S*) bestimmen.

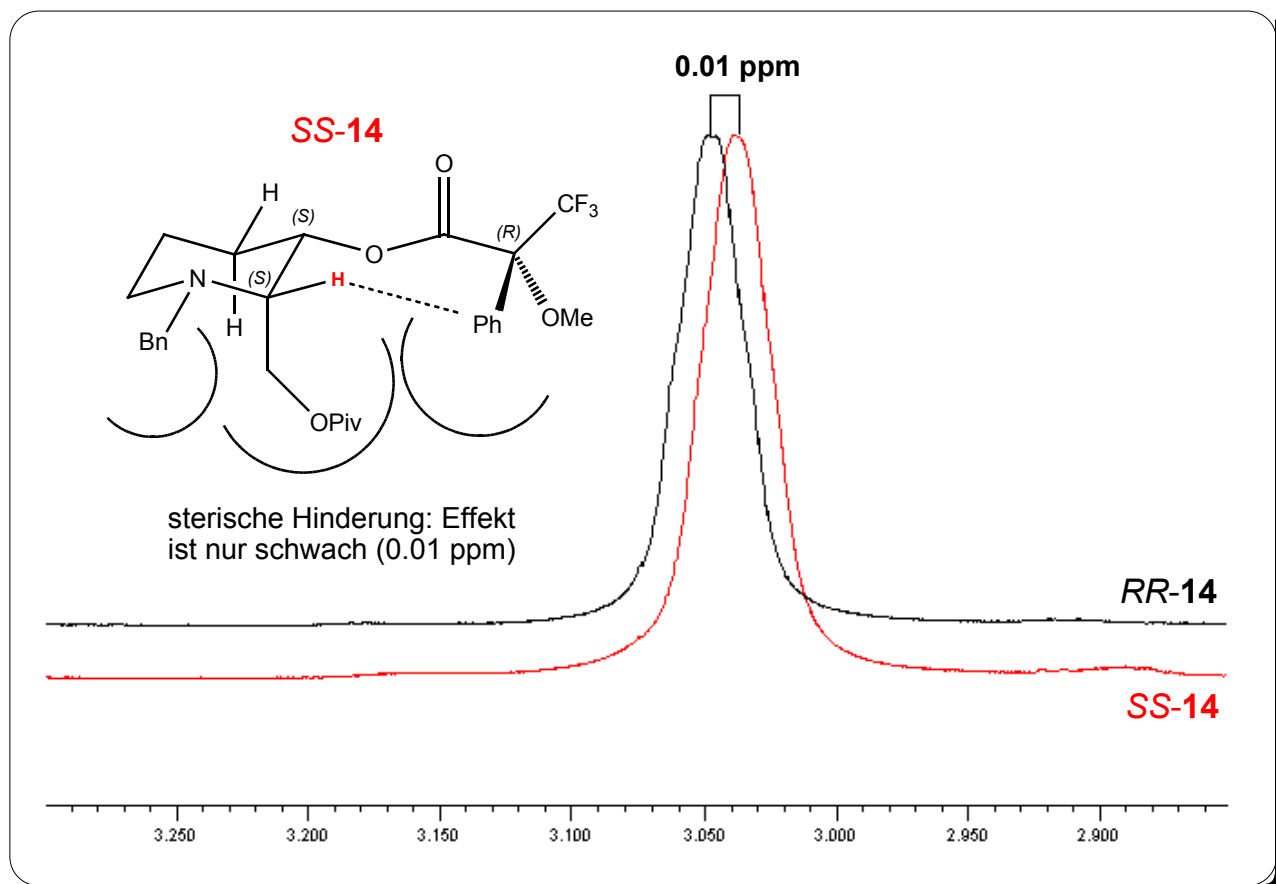


Abbildung 27: Vergleich der NMR-Signale des H-C(2) von RR-14 (schwarz) und SS-14 (rot). Das Modell zeigt die absolute Konfiguration von SS-14.

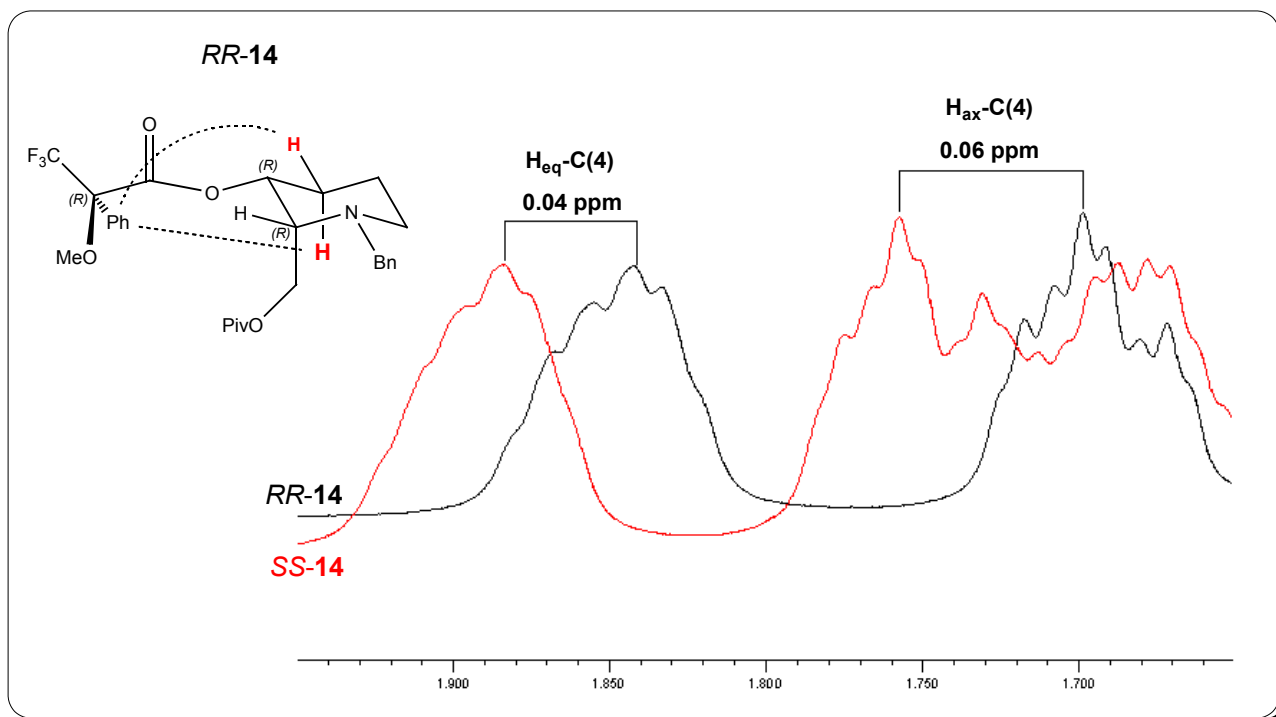


Abbildung 28: Vergleich der NMR-Signale der H₂-C(4) von RR-14 (schwarz) und SS-14 (rot). Das Modell zeigt die absolute Konfiguration von RR-14.

Nun war noch offen, welches Derivat welchem Diol entspricht. Um dies zu bestimmen, wurden die *cis*-MTPA-Derivate zu den entsprechenden Diolen verseift (EtOH/H₂O, KOH, RT, vgl. Übersichtsschema S. 150 unten). Es wurden Ausbeuten von > 90% erreicht. Durch ¹H-NMR Analysen konnte eine Verunreinigung mit optisch aktiver "MOSHER-Säure" ((+)-*R*-MTPA, $[\alpha]_D^{20} = + 73.1$) ausgeschlossen werden.

Anschliessend wurden die optischen Drehwerte der Diole gemessen. Das Diol, welches aus der Verseifung von *RR*-**14** stammte, hatte eine negative optische Drehung und konnte als (–)-**4** identifiziert werden. Das Diol aus der Verseifung von *SS*-**14** hatte eine positive Drehung und konnte dem (+)-**4** zugeordnet werden. Dieses Resultat wurde später durch die Röntgenstrukturanalyse von (+)-**6ax** (S. 240) bestätigt.

Die Bestimmung der absoluten Konfigurationen der 7-*N*-benzylierten *trans*- und *cis*-Diole ermöglichte erstmals eine vollständige Beschreibung aller 7-Aza enantiomerenreinen Piperidinderivate ((+)-**3**, (–)-**3**, (+)-**4** und (–)-**4**) mit chiroptischen Daten. In der Literatur sind jeweils nur ähnliche enantiomerenreine Verbindungen beschrieben [96][97]²⁶. Vor allem die freien Piperidinderivate (*cis*- und *trans*-3-Hydroxy-2-hydroxymethylpiperidine) sind aufgrund ihrer grossen pharmakologischen Bedeutung sehr oft untersucht worden [97 – 101]²⁶. Die absoluten Konfigurationen mit den dazugehörigen optischen Drehungen sind innerhalb dieser Serie von Publikationen konsistent. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht durch hydrogenolytische Abspaltung (H₂, Pd/C, RT) des *N*-Benzylsubstituenten bei (+)-**3**, (–)-**3**, (+)-**4** und (–)-**4** die zitierten Resultate zu reproduzieren. Die Überführung in die freien Piperidine scheiterte nach diversen Versuchen an der unzureichenden Reinheit der Produkte²⁷. Eine sehr interessante enantioselektive Synthese ist in [103] beschrieben. Das Produkt (**Abbildung 29** links, S. 71) ähnelt (+)-**3** ($[\alpha]_D^{25} = + 43.5$, *c* = 1.05, EtOH) von allen oben zitierten Verbindungen am meisten und hat zudem eine

²⁶ Die Auflistung der Literatur hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

²⁷ Die Reinigung der freien Piperidine ist aufgrund ihrer Basizität nur mit sehr grossem Aufwand zu bewerkstelligen.

positive optische Drehung ($[\alpha]_D^{23} = +14$, $c = 0.60$, MeOH). Der kleine Unterschied an C(3) (Me anstatt H) scheint also die chiroptischen Eigenschaften der Verbindung nicht signifikant zu beeinflussen.

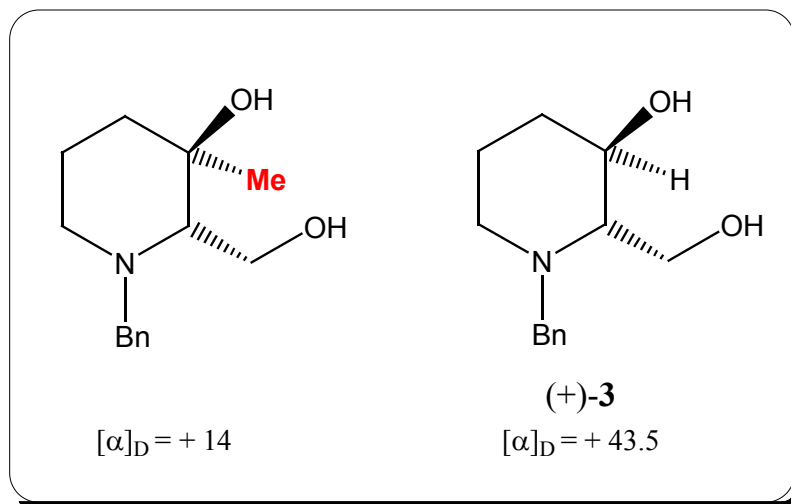
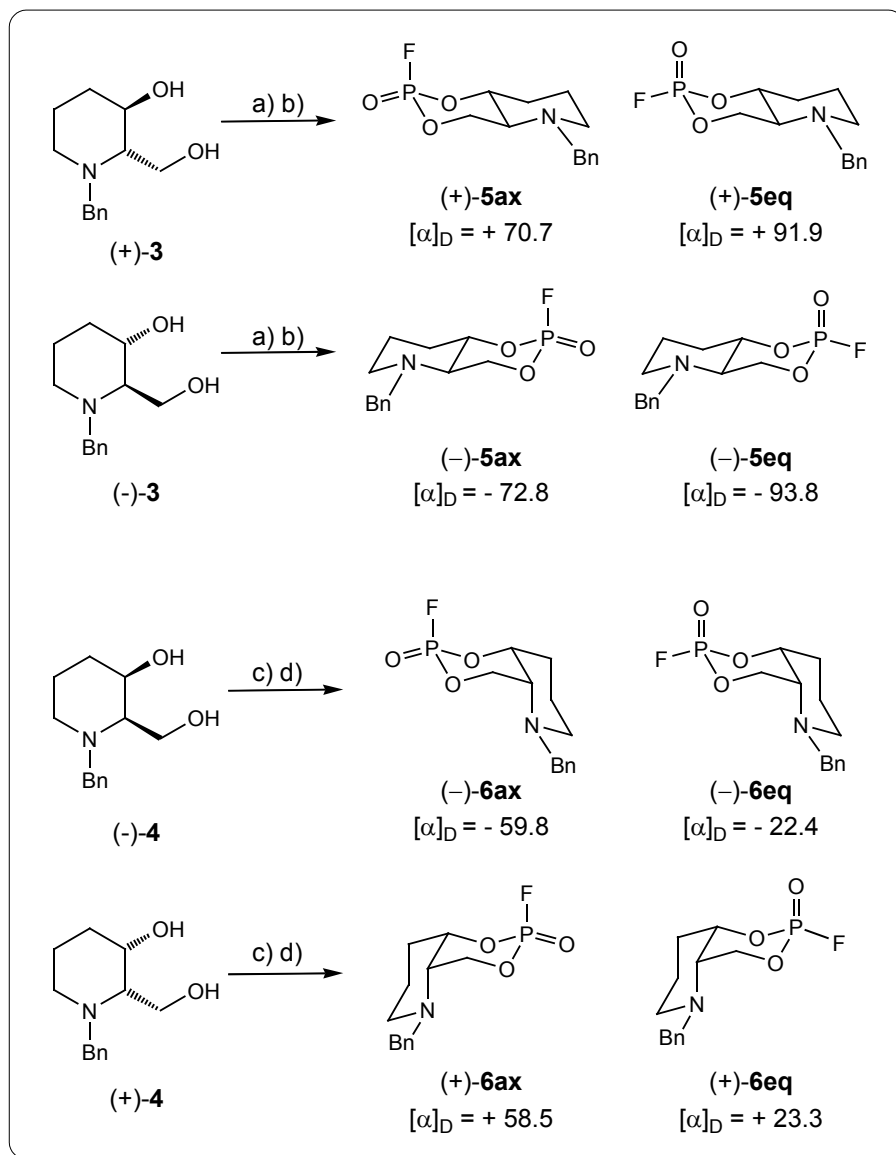


Abbildung 29: Zwei sehr ähnliche optisch aktive N-benzylierte Piperidinderivate. Links: Verbindung aus [103].

Zusammen mit den Untersuchungen von STREHLER [65] und LORENZETTO [70] mit den Piperidinen des Typs **I** (Mono-MOSHER-Derivate) und den Arbeiten von CLERC [71] und MATARAZZO mit den Piperidinen des Typs **II** (Mono- und erstmals auch Di-MOSHER-Derivate [104]) bestätigen die detaillierten Angaben zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der Piperidine des Typs **III** die allgemeine Einsetzbarkeit der MOSHER-Methode für alle unsere Verbindungen.

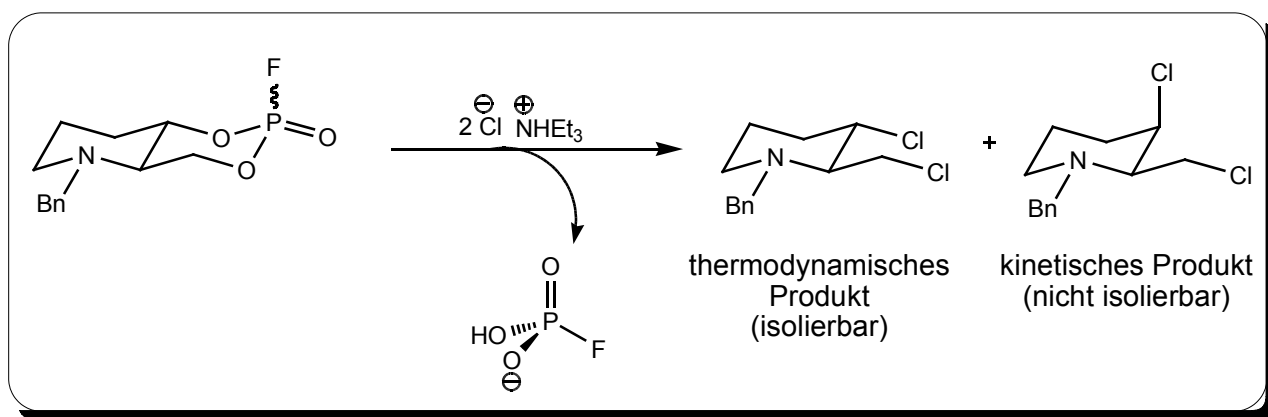
5.4 Synthese der optisch aktiven Acetylcholinmimetika



Schema 18: Synthese der optisch aktiven trans- und cis-Acetylcholinmimetika: a) Et_2O , Et_3N , POFCl_2 , $< 0^\circ\text{C}$, 1 – 2 min; b) Chromatographie (SiO_2 , $\text{Et}_2\text{O}/\text{Hexan}$ 2:1, 10 min); c) CH_2Cl_2 , Et_3N , POFCl_2 , $< 0^\circ\text{C}$, 1 – 2 min; d) Chromatographie (SiO_2 , $\text{AcOEt}/\text{Hexan}$ 1:1, 10 min).

Die optisch aktiven Diole **(+)-3**, **(-)-3**, **(+)-4** und **(-)-4** konnten in einem Reaktionsschritt in die entsprechenden optisch aktiven Acetylcholinmimetika übergeführt werden (**Schema 18**). Dazu wurden äquimolare Mengen an Diol und

POFCl₂ [105] zusammengegeben. Das entstehende HCl wurde mittels Triethylamin (pK_a = 10.8) abgefangen. Pyridin (pK_a = 5.2) reicht in diesem Fall als Base nicht aus, da es eine schwächere Base als die Piperidine (pK_a = 8.7 [2]) (+)-**3**, (–)-**3**, (+)-**4** und (–)-**4** ist und sich die Ammoniumchloride der Diole bilden. Die Reaktionsdauer betrug jeweils ein bis zwei Minuten. Bei längerer Reaktionsdauer entstand – wie in [2] beschrieben – das *trans*- und *cis*-Dichlorid, da das Triethylammoniumchlorid ein ausgezeichnetes Chlorierungsmittel ist und diese unerwünschte Nebenreaktion verursacht (**Schema 19**). Die Nebenprodukte konnten mittels DC (*R_f* (Et₂O) = 0.78 (*trans*), *R_f* (Et₂O) = 0.68 (*cis*)) und GC/MS nachgewiesen werden.



Schema 19: Unerwünschte Nebenreaktionen bei Reaktionszeiten > 3 min.

Die Synthese der equatorialen *trans*-Decaline konnte nur mit Mühe bewerkstelligt werden, da die F-equatorialen Organophosphate während der Reaktion sehr rasch epimerisierten. Durch langes Vorkühlen der Reaktionslösung (*ca.* 20 min auf < 0°C) konnte als bestes Resultat ein Epimerenverhältnis von 1.6:1 zugunsten des axialen Epimers erhalten werden. Dies konnte mittels ¹H- und ³¹P-NMR überprüft werden. Die Synthese der *cis*-Decaline war hingegen problemlos und konnte sogar in CH₂Cl₂ durchgeführt werden. Dadurch wurde die Filtration zum Abbruch der Reaktion erheblich erleichtert, da der Gegendruck auf der Säule im Vergleich mit Et₂O kleiner ist.

Die equatorialen und axialen Produkte konnten anschliessend säulenchromato-

graphisch getrennt werden. Dabei war allerdings wichtig, dass die Dauer der Trennung 10 min nicht überschritt, da ansonsten kein equatoriales Produkt mehr isoliert werden konnte. Durch die schnelle Trennung wurde jeweils ein beträchtlicher Teil an Mischfraktion erhalten, welche nochmals chromatographiert wurde. Die axialen Epimere waren auf SiO₂ stabil. Die isolierten Verbindungen wurden jeweils am HV getrocknet und die Gesamtausbeuten lagen zwischen 71% und 85%. Bei den *trans*-Organophosphaten wurde jeweils etwa die doppelte Menge an axialem Epimer isoliert. Bei den *cis*-Verbindungen betrug das Epimerenverhältnis *ca.* 1:1.

Die Unterscheidung der F-axialen und F-equatorialen Epimere konnte – wie schon in [2] erwähnt – nicht anhand der relativen chemischen Verschiebungen des Phosphors gemacht werden. Die *cis*-Organophosphate verhalten sich in Aceton-d₆ genau umgekehrt zur Theorie. Die *cis*-equatorialen Epimere haben eine chemische Verschiebung von – 15.6 ppm und die axialen Epimere von – 15.3 ppm. Daher wurde die Zuordnung unter Berücksichtigung des anomeren Effektes (**Kapitel 5.7.1**, S. 86) über die ³¹P_{p,H}-Kopplungen gemacht. Die Zuordnungen konnten anhand von Röntgenstrukturanalysen der *trans*- und *cis*-axialen Epimere bestätigt werden (siehe S. 239 und S. 240). Für die Röntgenstrukturanalyse wurde (–)-**5ax** aus Et₂O bei 5°C umkristallisiert und (+)-**6ax** aus Et₂O durch Diffusion von Pentan bei RT auskristallisiert.

Die Drehwerte der enantiomeren Organophosphate wurden in Aceton gemessen, um der Epimerisierung vorzubeugen. Sie stimmen im Betrag einigermaßen gut miteinander überein.

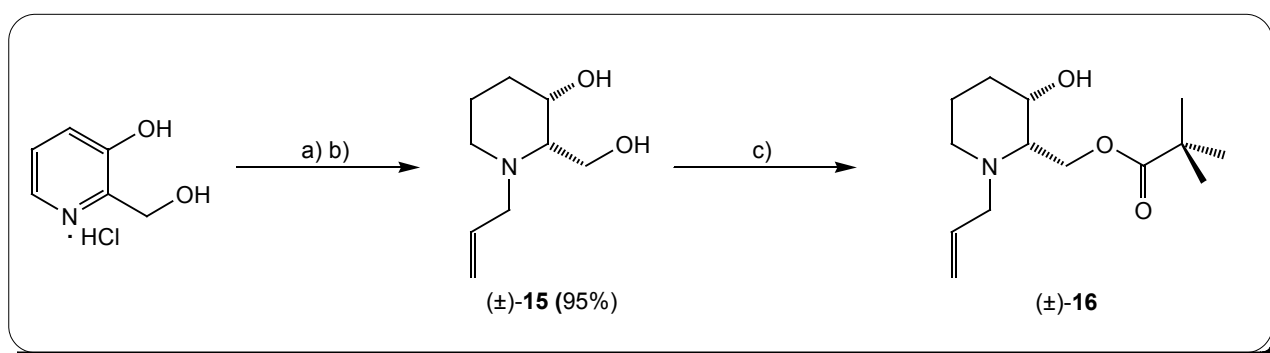
Die Schmelzpunkte der optisch aktiven *trans*-Decaline sind um *ca.* 20 – 30°C tiefer als die der racemischen Verbindungen. Das optisch aktive *cis*-axiale Epimer hat ungefähr den gleichen Schmelzpunkt wie das dazugehörige Racemat. Das optisch aktive *cis*-equatoriale Epimer ist ein Öl, während das Racemat ein Feststoff ist.

Die Verbindungen blieben bei – 20°C unter Argon stabil und epimerisierten nicht. In chlorierten Lösungsmitteln und in Wasser epimerisieren die equatorialen Organophosphate schnell zu den axialen Epimeren, wobei in Wasser der Vorgang viel

schneller ist und zusätzlich natürlich auch Hydrolyse auftritt. Die *trans*-equatorialen Decaline beginnen zudem auch in Aceton- d_6 bei -20°C innerhalb von wenigen Tagen zu epimerisieren. Die axialen Phosphadecaline sind dagegen auch in chlorierten Lösungsmitteln stabil.

5.5 Synthese der racemischen, *N*-Allyl-Acetylcholinmimetika

5.5.1 Synthese des *cis*-1-Allyl-2-(2,2 dimethyl-propoxy-1-oxomethyl)piperidin-3-ols



Schema 20: Synthese des Hydroxypivaloyl Esters (±)-**16**: a) H_2O ($\text{pH} = 3$), H_2 (60 bar), Rh (5% auf Al_2O_3), 18h, 35°C ; b) $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$, Na_2CO_3 , Allylbromid, 6h bei 95%; c) Pyridin, 1 Äq. Pivalinsäurechlorid, 48 h bei -20°C .

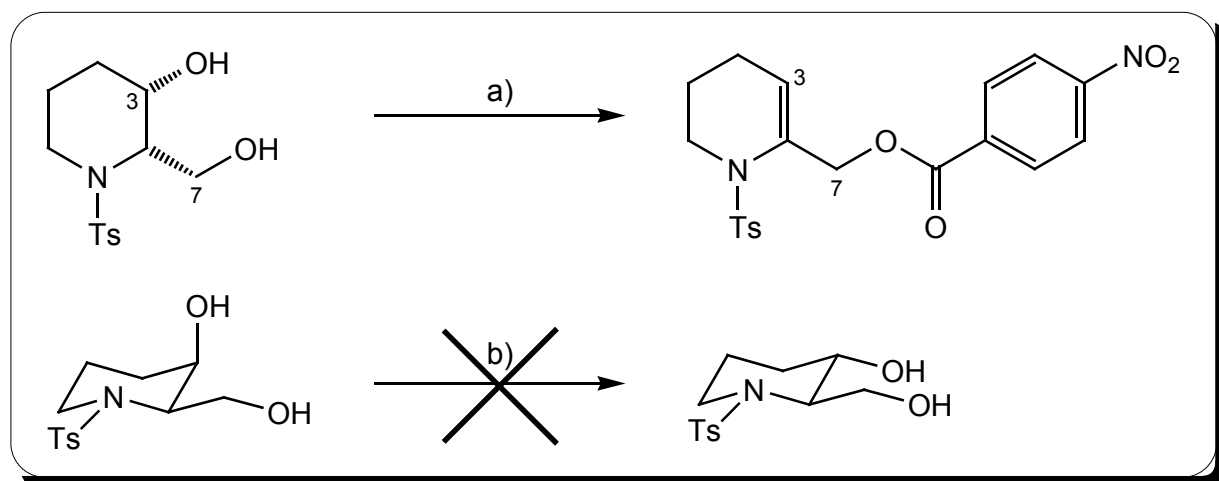
Die Abgangsgruppe X hat auf die Inhibitionseigenschaften einen erheblichen Einfluss, wie vor allem STÖCKLI zeigen konnte [60][74]. Der Einfluss des Substituenten am Stickstoff wurde allerdings noch nicht eingehend untersucht. Daher wurde die Synthese von allylschützten Acetylcholinmimetika durchgeführt (**Schema 20**). Die Allylgruppe ist sterisch weniger anspruchsvoll als die grosse Benzylgruppe, und durch den stärkeren Elektronendonoreffekt der Gruppe nimmt die Basizität der Verbindung zu. Es wurde erwartet, dass sich die Inhibitionseigenschaften durch diese Modifikation verändern würden. Zudem bietet die Doppelbindung des Allylderivates interessante synthetische Modifikations-möglichkeiten.

Die Synthese der racemischen, allylsubstituierten *cis*-Diole erfolgte analog zur

Synthese der benzylierten Verbindungen. Es wurde 2-(Hydroxymethyl)-pyridin-3-ol·HCl in H₂O (pH = 3) mit Rh (5% auf Al₂O₃) während 24 h bei 35°C und 60 bar H₂ hydriert. Das erhaltene kristalline Piperidiniumhydrochlorid konnte anschliessend mit Allylbromid in EtOH/H₂O mit Na₂CO₃ relativ leicht am Stickstoff substituiert werden. Mittels ¹H- und ¹³C-NMR konnte man nachweisen, dass zu ca. 95% das *cis*-Diol entstanden war und nur zu 5% das *trans*-Diol. Chromatographisch waren die Verbindungen auf dieser Stufe noch nicht unterscheidbar.

Die selektive Veresterung des primären Alkohols mit Pivalinsäurechlorid konnte unter vorsichtiger Reaktionsführung bei – 20°C während 48 h in Pyridin durchgeführt werden. Die Ausbeute an (±)-**16** als gelbliches Öl war mit 98% hervorragend. Die Verbindung erstarrte nicht wie der *N*-Benzyl-Ester nach der Trocknung am HV, sondern blieb als gelbliches Öl zurück. (±)-**16** wurde ohne zusätzliche Reinigungsschritte weiterverwendet.

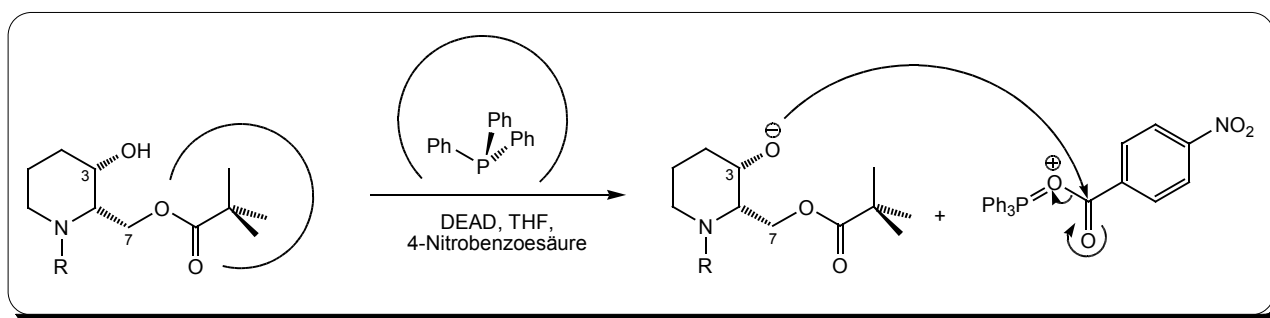
5.5.2 Versuche zur Konfigurationsumkehr an C(3) und *cis/trans*-Equilibrierung via SWERN-Oxidation



Schema 21: Zusammenfassung der Versuche zur Konfigurationsumkehr an C(3) von FUREGATI [2]. a) Toluol/THF, PPh₃, 4-Nitrobenzoesäure, DIAD oder DEAD, – 25°C bis RT; b) *i*-PrOH, Ni°, 81 – 83°C.

FUREGATI hat während seiner Dissertation [2] einige Experimente zur Konfigurationsumkehr an C(3) durchgeführt. Unter anderem hat er versucht, an *N*-tosyliertem *cis*-Diol mittels MITSUNOBU-Reaktion [106] mit 4-Nitrobenzoesäure eine Umkehr zu bewerkstelligen. Dies führte jedoch auch bei -30°C zur vollständigen Elimination der sekundären Hydroxygruppe. Weiter probierte er nach [107] mittels RANEY-Nickel eine *cis/trans*-Equilibrierung, welche jedoch überhaupt nicht funktionierte (siehe **Schema 21**, S. 76).

Im Rahmen einer Projektarbeit von OBERHOLZER unter meiner Leitung im Organisch-Chemischen Praktikum II wurde versucht, an *cis*-1-Allyl/Benzyl-2-(2,2-dimethylpropoxy-1-oxomethyl)piperidin-3-ol mittels MITSUNOBU-Reaktion nach [108] an C(3) eine Konfigurationsumkehr herbeizuführen. Dies gelang weder beim Allyl- noch beim Benzyl-Piperidin. Es wurde zwar jeweils der 4-Nitrobenzoesäureester mit schlechten Ausbeuten isoliert, doch anstatt Inversion an C(3) erhielt man in beiden Fällen Retention. Dieser Befund konnte nur damit erklärt werden, dass sich während der Reaktion das Phosphoniumsalz der 4-Nitrobenzoesäure gebildet hatte, anstatt jenes des jeweiligen Pivaloylesters. Anschliessend fand der Angriff der Hydroxygruppe an die Carbonylfunktion der Säure statt, und der 4-Nitrobenzoesäureester konnte sich unter Retention der Konfiguration bilden (siehe **Schema 22**).



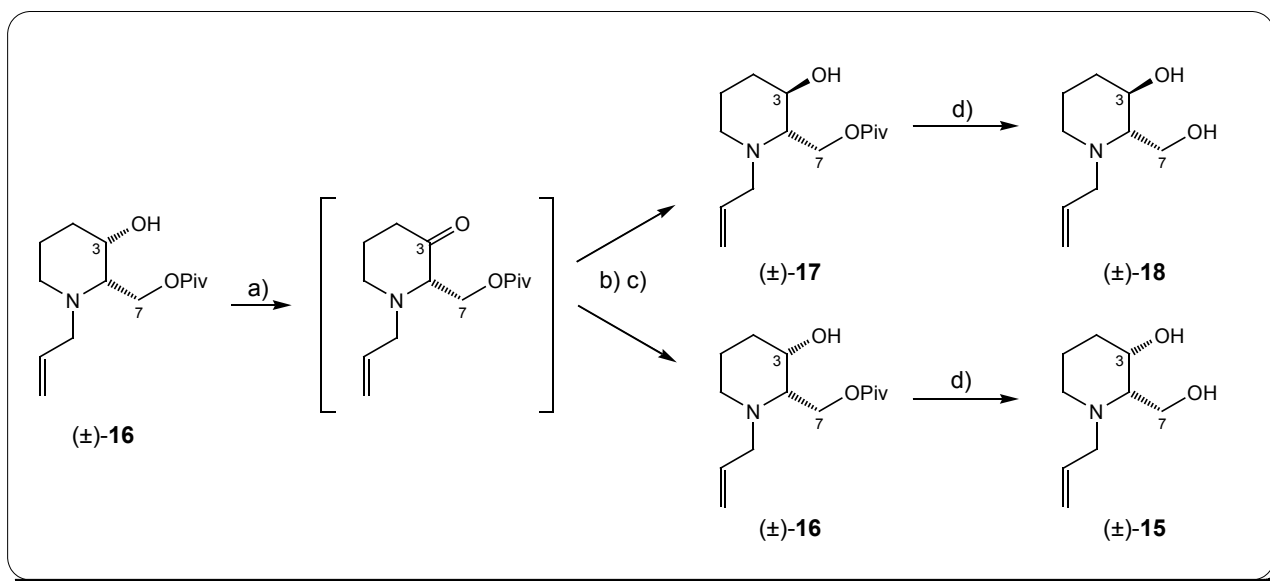
Schema 22: Postulierter Mechanismus für die MITSUNOBU-Reaktion zur Erklärung der Retention der Konfiguration an C(3). R = Allyl, Benzyl.

Es wird vermutet, dass aufgrund der sterischen Hinderung des Pivaloylesters die Bildung des Phosphoniumsalzes des Piperidins verunmöglicht wird und stattdessen

die sterisch weniger anspruchsvolle 4-Nitrobenzoesäure den Phosphor angreift machte und das Phosphoniumsalz bildet.

Die ^1H -NMR Spektren der 4-Nitrobenzoate deuteten aufgrund der kleinen $^3J(2,3)$ -Kopplung auf den *cis*-Diester hin. Um jeden Zweifel an dieser Interpretation auszuräumen, wurden die *cis*-1-Benzyl- resp. *cis*-1-Allyl-2-((pivaloyloxy)methyl)piperidin-3-yl-4-nitrobenzoate wieder in die entsprechenden Diole übergeführt. Durch Vergleichen der ^1H -NMR Spektren mit denjenigen von (–)-**4**/(+)-**4** und (±)-**15** konnte eindeutig gezeigt werden, dass die MITSUNOBU-Reaktion unter Retention der Konfiguration an C(3) abgelaufen war.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf weitere Versuche verzichtet, die Konfigurationsumkehr an C(3) herbeizuführen. Stattdessen wurde mit der Standardsynthese nach [2] weitergefahren und eine *cis/trans*-Equilibrierung durchgeführt (Siehe *Schema 23*).

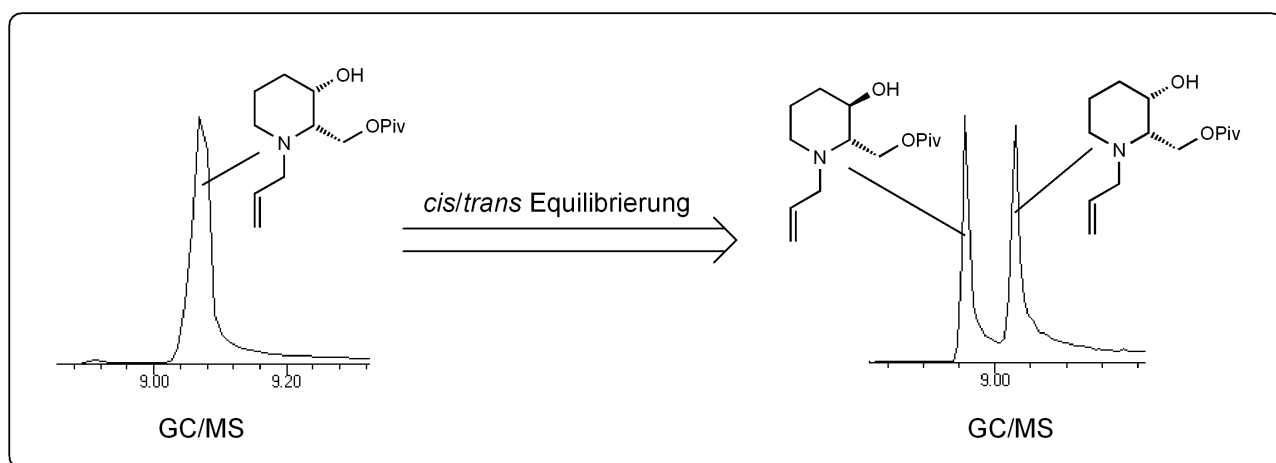


Schema 23: *cis/trans*-Equilibrierung der N-Allyl-Hydroxyester mit anschließender Verseifung zu den Diolen: a) SWERN-Oxidation, -70°C - RT; b) EtOH, NaBH_4 , -15°C ; Chromatographie (SiO_2 , AcOEt/Hexan 3:1, 0.5% Et_3N); d) EtOH/ H_2O , KOH, 5 h, RT.

Um genügende Mengen *trans*-Diol (±)-**18** zu erhalten, wurde das *cis*-1-Allyl-2-(2,2-dimethylpropoxy-1-oxomethyl)piperidin-3-ol unter Stickstoffatmosphäre zuerst

mittels SWERN-Oxidation zum Ketoester oxidiert und anschliessend *in situ* mit NaBH₄ wieder zum Hydroxyester reduziert. Der benzylgeschützte Ketoester aus [2] ist an der Luft nicht stabil, weshalb auch bei dieser Synthese auf eine Isolierung des Ketoesters verzichtet wurde.

Die *cis/trans*-Equilibrierung konnte mittels GC/MS verfolgt werden (**Schema 24**). Man erhielt ein 1:1 *cis/trans*-Epimerengemisch, welches anschliessend mittels Säulenchromatographie in die diastereoisomerenreinen Verbindungen getrennt werden konnte. Die Trennung war nicht optimal, da sie mehrmals durchgeführt werden musste, weil ein grosser Teil jeweils als Mischfraktion anfiel. Zudem blieb ein grosser Teil der *cis*-Verbindung an der Säule haften. Da die Trennung schlussendlich in relativ kurzer Zeit zu genügend diastereoisomerenreinen Produkten führte, wurde auf eine weitere Optimierung verzichtet.



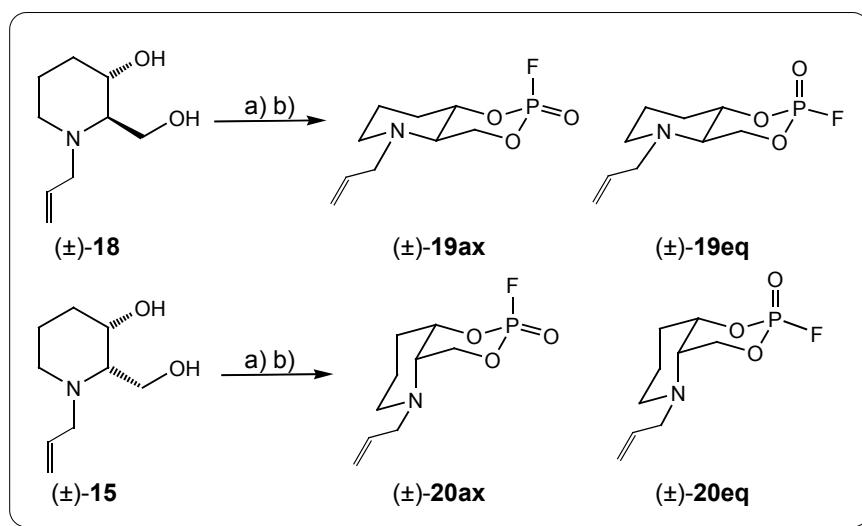
Schema 24: GC/MS-Analyse der *cis/trans*-Equilibrierung der N-Allyl-Hydroxyester.

Die Bestimmung der relativen Stereochemie (*cis/trans*) der Diester konnte anhand der vicinalen Kopplungen des H-C(3) und H-C(2) in den ¹H-NMR Spektren vorgenommen werden. Nach der Verseifung der Diester mit KOH zu den Diolen konnte das *trans*-Diol ((±)-**18**) anhand der noch etwas grösser gewordenen vicinalen Kopplung von H-C(3) zu H-C(2) (³*J* = 6.4) eindeutig zugeordnet werden. Beim *cis*-Diol ((±)-**15**) war die vicinale Kopplung nicht aufgelöst, was aber aufgrund der

eindeutigen Identifizierung des *cis*-Diesters kein Problem war.

Die Rohausbeute vor der Säulenchromatographie war mit 86 % relativ gut. Durch die schlechte Trennung reduzierte sich jedoch die Ausbeute noch um *ca.* 40%.

5.5.3 Die *N*-allylierten Acetylcholinmimetika



Schema 25: Synthese der racemischen *trans*- und *cis*-ACh- Mimetika: a) CH_2Cl_2 , Et_3N , POFCl_2 , $< 0^\circ\text{C}$, 1 – 2 min; b) Chromatographie (SiO_2 , Et_2O , 10 – 15 min).

Die Synthese der *N*-Allyl Acetylcholinmimetika machte nach den Erfahrungen mit den *N*-Benzyl-Verbindungen keine Probleme. Zudem sind die *N*-Allyl F-equatorialen Organophosphate stabiler als ihre benzylierten Verwandten. Bei den *trans*-Verbindungen konnte sogar mehr vom equatorialen Epimer isoliert werden, was schon etwas überraschte. Daher konnten die Reaktionen in CH_2Cl_2 durchgeführt werden, was wiederum die Filtration zum Abbruch der Reaktion vereinfachte.

Die Zunahme der Basizität der Piperidine durch die Einführung der Allylgruppe war indes nicht so stark, sodass Triethylamin erneut als Base zum Abfangen von HCl ausreichte. Es wurde wie bei den Benzylverbindungen während der Reaktion auf $< 0^\circ\text{C}$ gekühlt, obwohl bei der Synthese der *trans*-Verbindungen eine etwas höhere Reaktionstemperatur wahrscheinlich ein ausgeglicheneres Epimerenverhältnis

ergeben hätte.

Die Allyl-Acetylcholinmimetika sind wie alle Verbindungen dieses Typs nicht kristallin. (±)-**19ax**, (±)-**19eq** und (±)-**20ax** sind bei RT gelbliche Öle, wobei (±)-**19ax** und (±)-**20ax** bei – 20°C wachsartig erstarren. (±)-**20eq** ist bei RT ein gelbliches Wachs, welches bei Berührung mit dem Spatel sofort klebrig und ölig wird.

Die Ausbeuten waren mit durchschnittlich 60% um rund 20% schlechter als bei den Benzyl-Acetylcholinmimetika. Zudem wurden im ³¹P-NMR Spektrum des F-axialen *cis*-Decalins rund 5% F-axiales *trans*-Decalin gefunden. Dies war auf die nicht optimale chromatographische Trennung der *cis/trans*-Hydroxyester zurück-zuführen. Der kleine Anteil an *trans*-Organophosphat konnte aber aufgrund der idealen *R_f*-Werte in Et₂O (*R_f*((±)-**19ax**) = 0.34, *R_f*((±)-**20ax**) = 0.27) abgetrennt werden.

5.6 Röntgenstrukturanalysen der Organophosphate

Aufgrund der sich immer weiter entwickelnden Technik bei der Röntgenstrukturanalyse ist es mittlerweile möglich, mit Phosphor als Schweratom die Absolutkonfiguration von Molekülen zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurden Kristalle der F-axialen *cis*- sowie *trans*-Acetylcholinmimetika (+)-**6ax** und (–)-**5ax** gezüchtet, anhand derer die in **Kapitel 5.3** bestimmten absoluten Konfigurationen bestätigt werden konnten. Das Decalin (–)-**5ax** hat die (1*S*,3*S*,6*R*)- und (+)-**6ax** hat die (1*S*,3*R*,6*S*)-Konfiguration (vgl. **Abbildung 30** und **Abbildung 31**).

Die Abgangsgruppe F wird durch den anomeren Effekt in der axialen Position stabilisiert, weshalb beide Verbindungen im Kristall im Doppelsessel (**Sessel-1**²⁸) vorliegen. Der Benzylsubstituent liegt, wie zu erwarten ist, in der sterisch günstigeren equatorialen Position am Stickstoff.

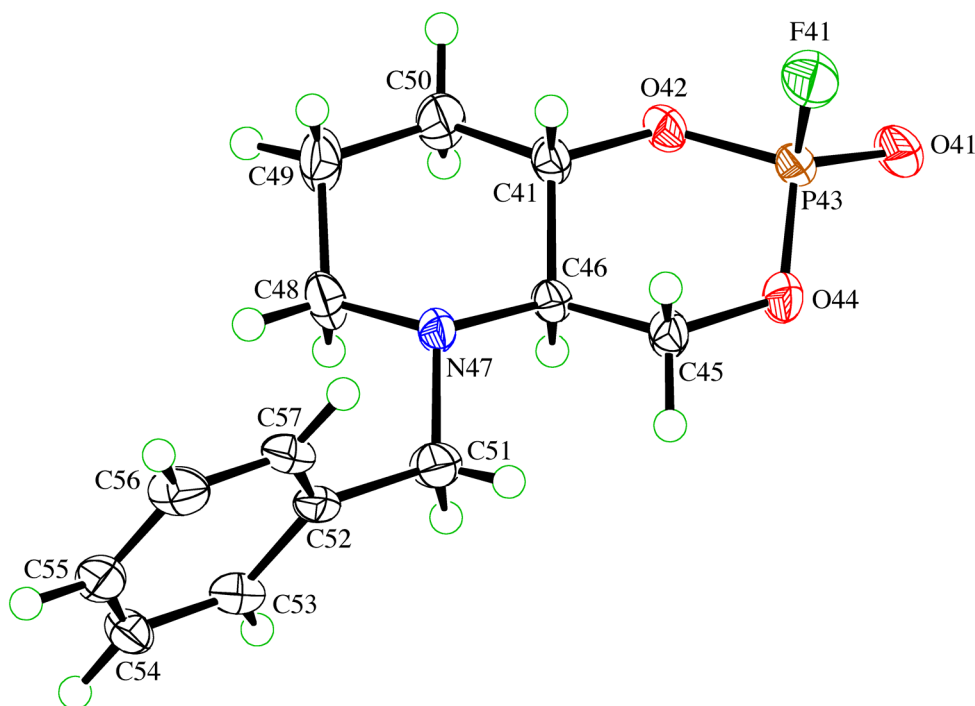


Abbildung 30: Kristallstruktur von (–)-**5ax**.

²⁸ Die Ausdrücke **Sessel-1**, **Sessel-2** und **TB-2** sind in **Tabelle 9** (S. 93) durch Modelle erläutert.

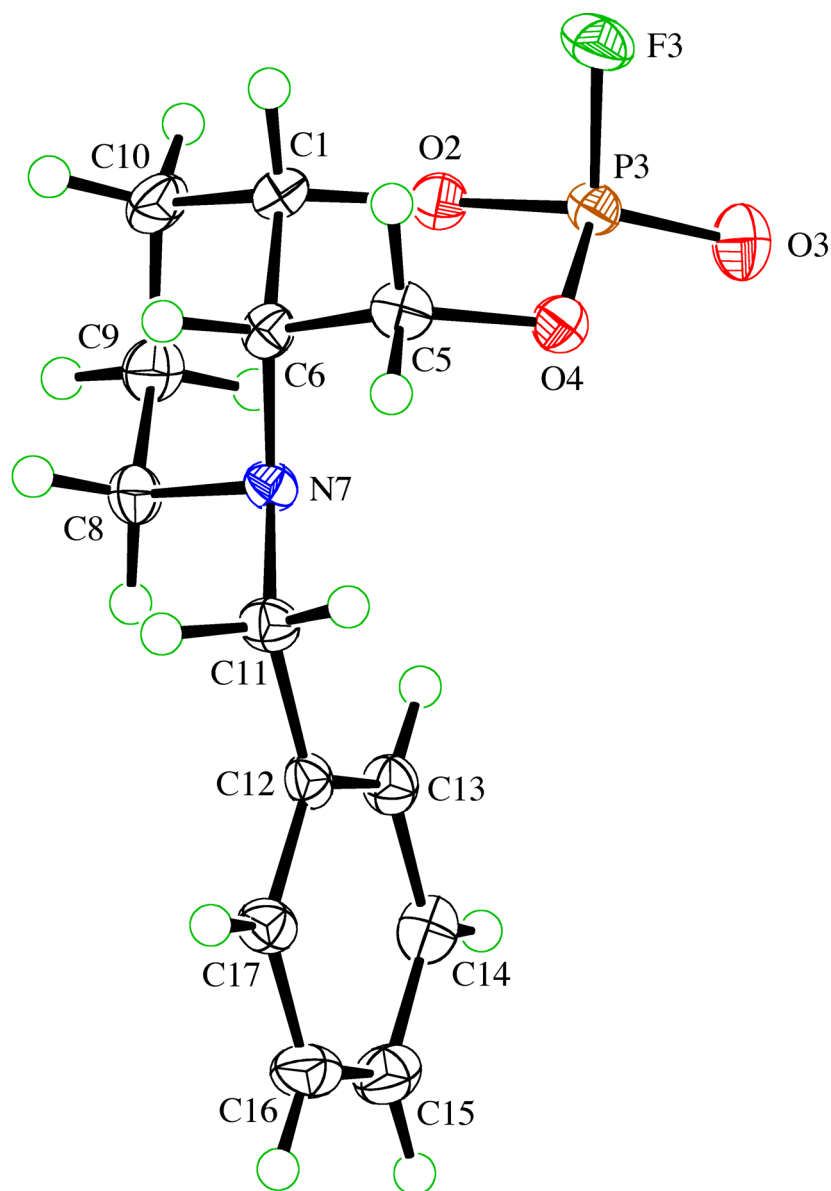


Abbildung 31: Kristallstruktur von (+)-6ax.

Während der Diplomarbeit [1] gelang es, sechs der acht enantiomerenreinen carbocyclischen Organophosphate zu kristallisieren und anhand der Röntgenstrukturanalysen die absoluten Konfigurationen zu bestimmen. Die optisch aktiven F-axialen *cis*-Decaline sind Öle und konnten deshalb nicht kristallisiert werden. In den **Abbildungen 32** und **33** (S. 84 resp. 85) sind die Kristallstrukturen der carbocyclischen Verbindungen der Übersicht wegen nochmals gezeigt. Dabei ist zu beachten, dass das F-equatoriale *cis*-Decalin als doppelt umgeklappter Doppelsessel (**Sessel-2**, vgl. **Tabelle 9**, S. 93) vorliegt. Das ist nicht *a priori* zu erwarten, denn die

strukturellen Änderungen vom Doppelsessel mit F in equatorialer Position (**Sessel-1**) zum Doppelsessel mit F in axialer Position (**Sessel-2**) scheinen beim groben Abschätzen energetisch aufwändiger als die Änderungen vom **Sessel-1** zur *Twist-Boat*-Konformation (**TB-2**).

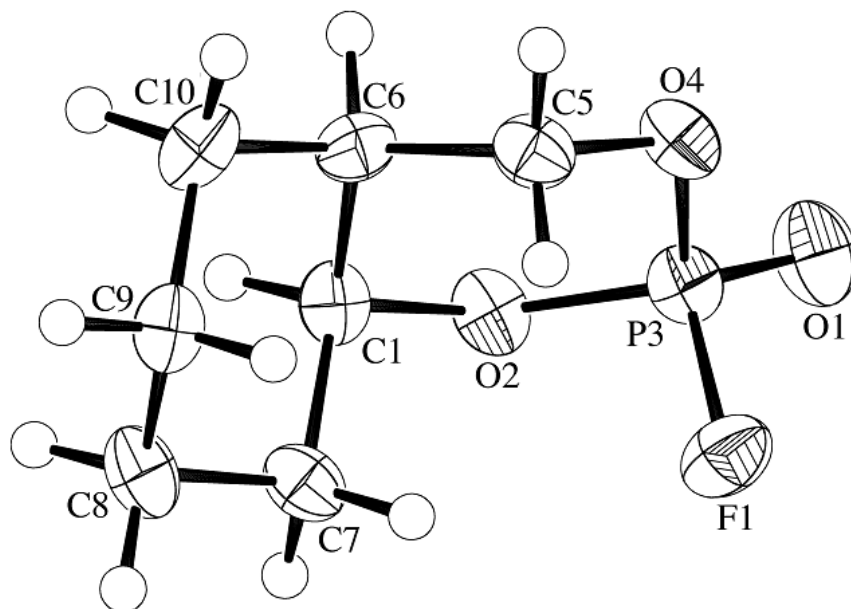


Abbildung 32: Kristallstruktur von (+)-8ax als **Sessel-2**²⁸.

Semiempirische Berechnungen (Ampac²⁹ [109], AM1²⁹ [110]) der einzelnen Konformationen in verschiedenen Lösungsmitteln (Et₂O, Aceton, usw.) haben aber darauf hingewiesen, dass sich die verschiedenen Konformationen des carbocyclischen F-equatorialen *cis*-Decalins (**Sessel-1**, **Sessel-2** und **TB-2**) energetisch nur geringfügig (< 1.3 kcal/mol) voneinander unterscheiden. In Aceton und Et₂O kann man also davon ausgehen, dass bei RT mindestens 10% des **Sessel-2** vorliegt³⁰. Zudem ist das Dipolmoment vom **Sessel-2** viel grösser als dasjenige des

²⁹ Semiempirische Programme machen grundsätzlich grosse systematische Fehler bei der Berechnung von Bildungsenergien (Vertrauensbereich von AM1 in diesem Fall ± 15 kcal/mol [111]) von Molekülen mit hypervalenten funktionellen Gruppen (Phosphate, Nitrogruppen, usw.). Die Fehler sind additiv. Das heisst, je mehr solche hypervalente funktionelle Gruppen ein Molekül hat, desto grösser wird der Fehler. Da in diesem Beispiel hier die Konformationen eines einzelnen Moleküls (Idealfall einer isodesmischen Reaktion) miteinander verglichen werden, ist der systematische Fehler der Bildungsenergien in allen Strukturen in etwa gleich gross. So kann man davon ausgehen, dass die berechneten absoluten Werte der Bildungsenergien zwar weit von der Realität entfernt sind, die relativen Energiedifferenzen aber in ihrer Grössenordnung stimmen. Die systematischen Fehler heben sich in diesem Fall bei der Bildung von Differenzen wieder auf.

³⁰ Berechnet nach $\Delta G^\circ = -RT \ln(K)$ und $\frac{N_i}{N_j} = e^{-\frac{E_i - E_j}{RT}}$.

Sessel-1, was heisst, dass der **Sessel-2** in polaren LM noch zusätzlich stabilisiert wird. Zusätzlich können durch die abgegebene Kristallisationsenergie bei organischen Verbindungen, Konformationen mit Energien von bis zu 3 kcal/mol über dem globalen Minimum stabilisiert und dadurch begünstigt werden [111]. So kann die Entstehung der Kristallstruktur mit **Sessel-2**-Konformation rationalisiert werden. Das F-equatoriale *trans*-Decalin kristallisiert, stabilisiert durch den anomeren Effekt, in der *Twist-Boat*-Konformation (**TB-2**) aus. Dies verdeutlicht nochmals den grossen Einfluss dieses stereoelektronischen Effekts.

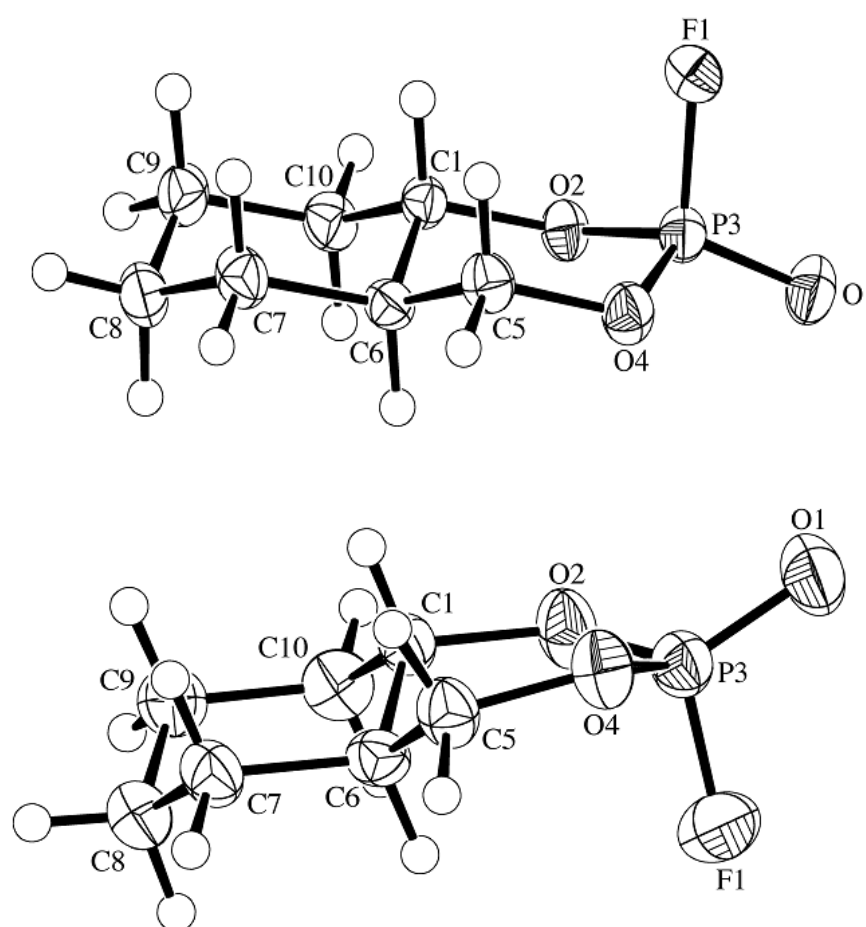


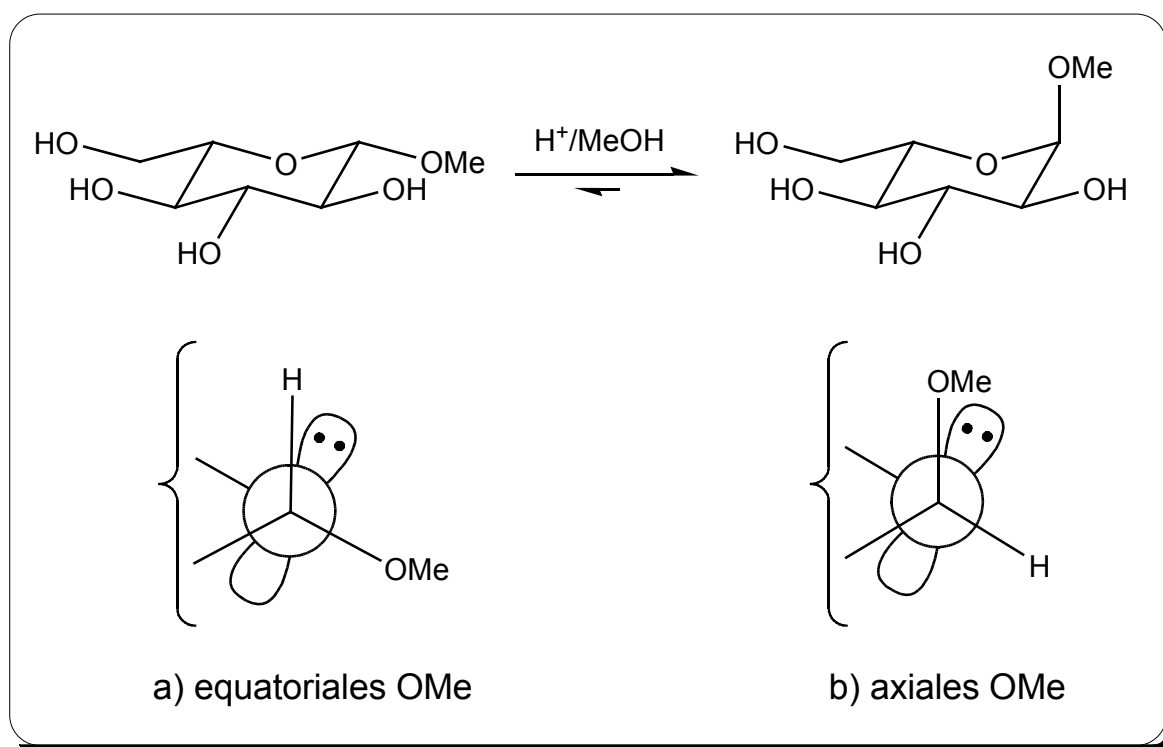
Abbildung 33: Kristallstrukturen der optisch aktiven carbocyclischen Organophosphate; oben: (–)-**7ax** als **Sessel-1**; unten: (–)-**7eq** als **TB-2**.

5.7 Konformationsanalyse der Organophosphate in Lösung

5.7.1 Der anomere Effekt

Wie in [75] eindrücklich gezeigt wird, werden die Konformationen der bicyclischen Organophosphate wesentlich durch den anomeren Effekt beeinflusst.

Dieser stereoelektronische Effekt ist vor allem aus der Zuckerchemie bekannt. In 2-Hydroxytetrahydropyran steht die Hydroxygruppe bevorzugt in axialer Position, wohingegen im Cyclohexanol die Hydroxygruppe in der sterisch günstigeren equatorialen Position liegt. Die beste Illustration des anomeren Effektes sind die Gleichgewichte von Methylglykosiden, welche jeweils auf der Seite der MeO-axialen Epimere liegen (vgl. **Schema 26**).



Schema 26: Konformationen der 2-Hydroxytetrahydropyrane.

Die Erklärung für die Stabilisierung des axialen Epimers ist die Überlappung des *lonepairs* des Ringsauerstoffes mit dem σ^* -Orbital der exocyclischen C–O-Bindung.

Wenn die C–O Bindung axial steht, dann überlappt das σ^* -Orbital am besten mit dem p -förmigen *lonepair*. Liegt die C–O-Bindung jedoch equatorial, so überlappt das σ^* -Orbital der C–H-Bindung mit dem *lonepair*. Da die σ^* -Orbitale der C–O-Bindungen in den diversen Pyranen im Durchschnitt energetisch tiefer liegen als die der C–H Bindungen, bringen die Überlappungen mit den σ^* -Orbitalen der C–O-Bindungen auch einen höheren Energiegewinn als diejenigen mit der C–H-Bindung (vgl. **Abbildung 34**). Deshalb liegt das elektronegrativere Atom in den meisten Pyranen auch in axialer Position [112]. Weiter führt der anomere Effekt zu einer effektiven Verkürzung der cyclischen O–C-Bindung, während sich die axiale exocyclische C–O-Bindung durch den erhöhten antibindenden Anteil (σ^* -Orbital) verlängert.

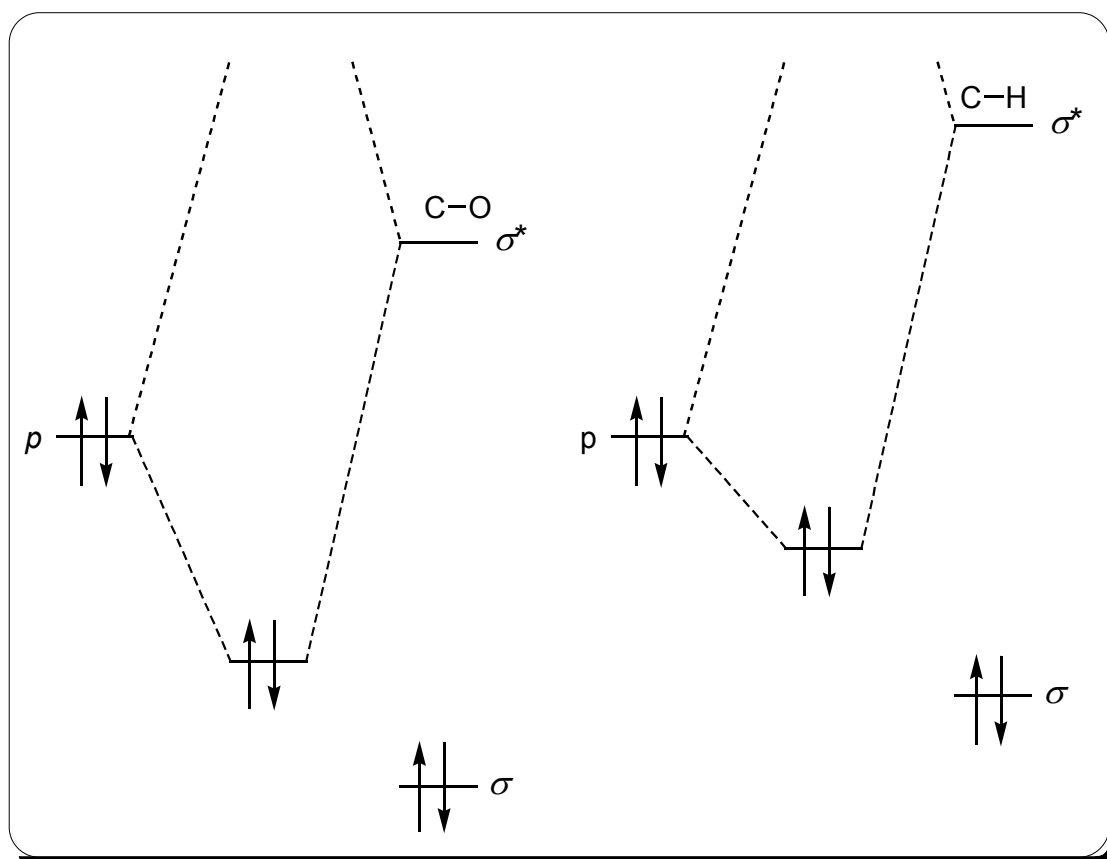


Abbildung 34: Überlappung des lonepairs (p) mit den σ^* -Orbitalen der C–O- und der C–H-Bindung.

Der anomere Effekt wirkt analog zu den oben erwähnten Beispielen auch in den

Organophosphadecalinen. Die exocyclische C–O-Bindung wird durch die P–X-Bindung (X = F, ODNP, usw.) und die C–H-Bindung durch die P=O-Bindung repräsentiert. Der schon sterisch bevorzugte Doppelsessel (**Sessel-1**) der F-axialen Organophosphadecaline wird durch den anomeren Effekt elektronisch noch stärker stabilisiert, weil der Effekt in der Doppelsesselkonformation am besten wirken kann. Die F-equatorialen Phosphadecaline werden in pseudo-axiale Konformationen gezwungen, oder sie klappen, wie im Fall der carbocyclischen *cis*-Verbindungen, doppelt um.

5.7.2 Modifizierte KARPLUS-Gleichung

Um Konformationsanalysen in Lösung durchführen zu können, muss man auf die KARPLUS-**Gleichung 8** zurückgreifen. Die Gleichung stellt einen Zusammenhang zwischen der $^3J(\text{P,H})$ und dem Diederwinkel Φ zwischen der P–O-Bindung und der C–H-Bindung (mit dem Blick entlang der O–C-Bindung) her [56].

$$^3J_{PH}(\Phi) = \alpha \cos^2 \Phi + \beta \cos \Phi + \gamma \quad (8)$$

In [2][75] wurde anhand von Kristallstrukturdaten und $^3J(\text{P,H})$ -Kopplungen der F-axialen Organophosphate eine modifizierte KARPLUS-Gleichung erstellt (vgl. auch **Kapitel 4.3**, S. 33). Dazu wurden die $^3J(\text{P,H})$ der Wasserstoffe³¹ H_{ax}-C(5) (**H_A**), H_{eq}-C(5) (**H_B**) und H-C(1) (**H_C**)³² gegen die dazugehörigen Diederwinkel aus den Röntgenstrukturanalysen aufgetragen und mittels der **Gleichung 8** die KARPLUS-Kurve an die Daten angepasst. Anhand dieser Kurve können nun Konformationen von Organophosphadecalinen nur anhand ihrer $^3J(\text{P,H})$ -Kopplungen abgeschätzt werden.

31 Die Daten wurden nur aus den Experimenten mit den F-axialen Organophosphaten genommen, da der Doppelsessel in diesen Verbindungen sterisch und auch elektronisch begünstigt ist und man deshalb annehmen kann, dass die Struktur in Lösung sehr gut mit der Kristallstruktur übereinstimmt.

32 Die Bezeichnungen "ax" und "eq" beziehen sich immer auf Position im **Sessel-1** (vgl. **Tabelle 9**, S. 93).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anpassung³³ der KARPLUS-Kurve durch Beifügen der Daten von (-)-**5ax**, (+)-**6ax** und (-)-**7ax** noch verfeinert (siehe *Tabelle 7*). Dadurch wurden die Werte für α , β und γ leicht verändert (siehe *Abbildung 35*). Durch die grössere Datenmenge konnte jedoch der Fehler der Anpassung (*fit*) minimiert werden. Das Konfidenzband (95%) in *Abbildung 35* zeigt, dass die modifizierte KARPLUS-Gleichung zwischen 60° und 180° einigermaßen verlässliche Abschätzungen der Diederwinkel Φ (ohne Vorzeichen) anhand der $^3J(\text{P,H})$ zulässt, jedoch zwischen 0° und 60° keine grosse Aussagekraft besitzt.

Tabelle 7: Experimentelle Daten für die Modifizierung der $KARPLUS$ -Gleichung

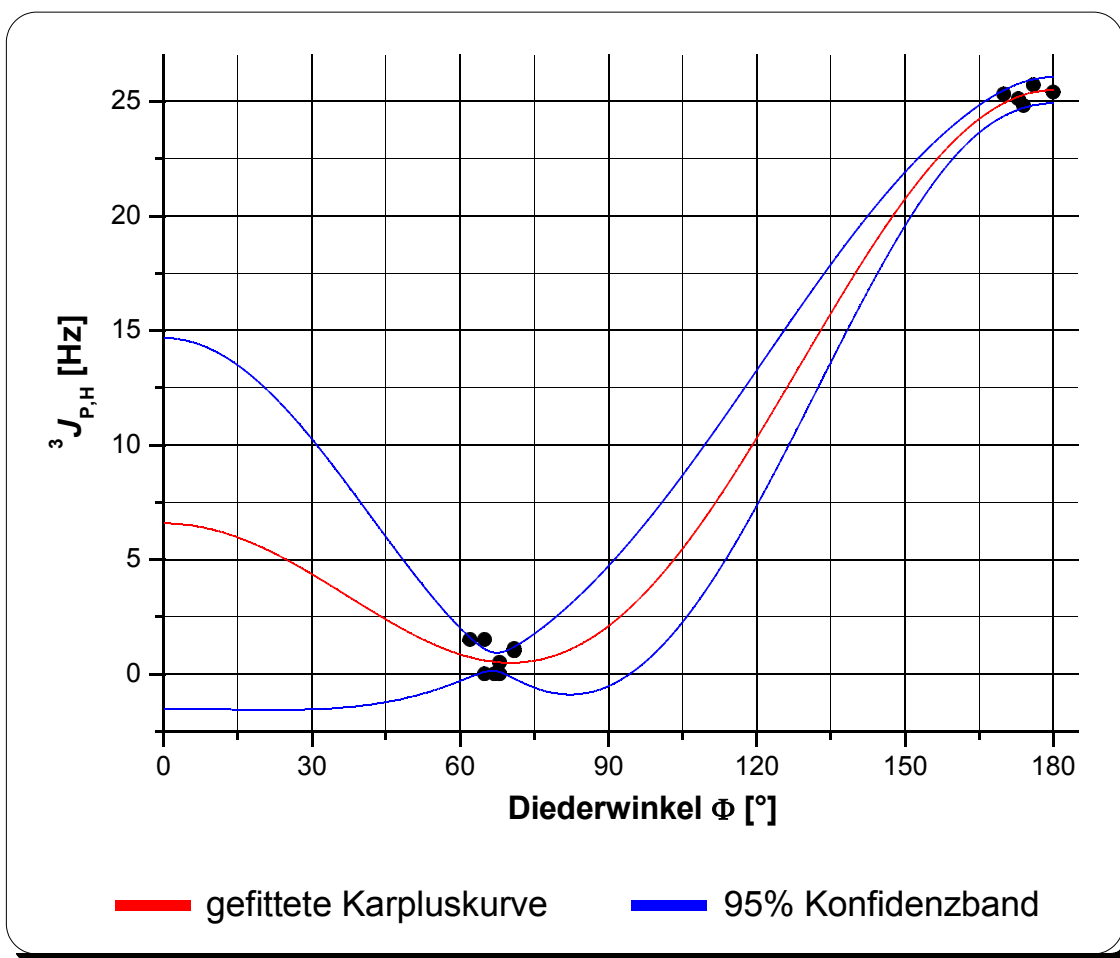


Abbildung 35: Modifizierte K_{ARPLUS} -Gleichung:
 $^3J(P,H) = \alpha \cos(\Phi)^2 + \beta \cos(\Phi) + \gamma$; $\alpha = 13.93$, $\beta = -9.46$, $\gamma = 2.10$.

5.7.3 Konformationsanalyse der F-axialen Decaline

Die Konformationsanalyse in Lösung lässt sich mit dem carbocyclischen F-axialen *cis*-Decalin und den F-axialen *cis*- und *trans*-Acetylcholinmimetika mit *N*-Allylsubstituent sehr einfach durchführen. Die Kopplungskonstanten $^3J(P,H)$ der Wasserstoffe $H_{ax}\text{-C}(5)$ (H_A), $H_{eq}\text{-C}(5)$ (H_B) und $H\text{-C}(1)$ (H_C) wurden aus den 1H - und/oder ^{31}P -NMR-Spektren abgelesen. Aus den Spektren ist zu entnehmen, dass alle F-axialen Verbindungen in **Sessel-1**-Konformation vorliegen (siehe **Abbildung 36**, S. 91). Dieser Befund ist aus sterischen und stereoelektronischen Gründen (anomerer Effekt) zu erwarten.

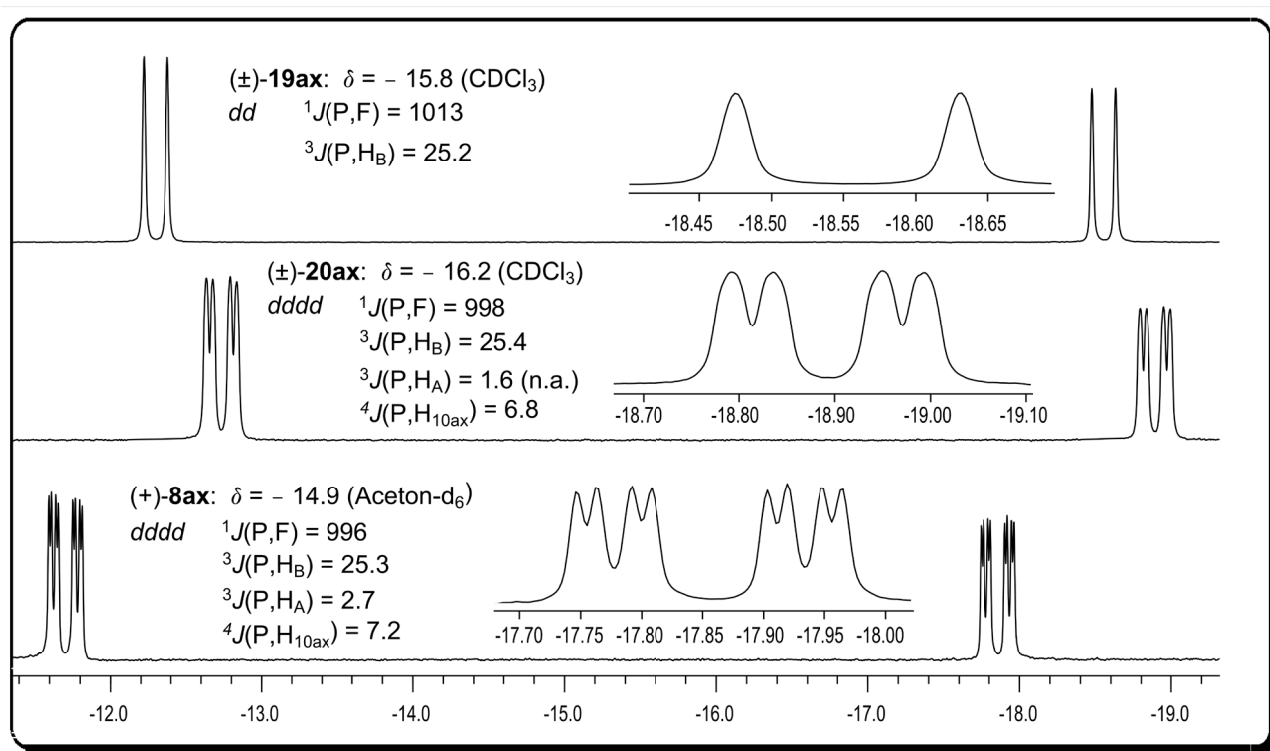


Abbildung 36: ^{31}P -NMR Spektren der F-axialen Organophosphate, 161.9 MHz, 300 K.

			H _A	H _B	H _C
	(±)- 19ax	Φ [°] (K _{AR} PLUS) $^3J(P,H)$ [Hz] (NMR, CDCl ₃)	~ 60 < 1	173 25.2	60 0
	(±)- 20ax	Φ [°] (K _{AR} PLUS) $^3J(P,H)$ [Hz] (NMR, CDCl ₃)	82 1.1	176 25.4	60 0
	(+)- 8ax	Φ [°] (K _{AR} PLUS) $^3J(P,H)$ [Hz] (NMR, Aceton-d ₆)	94 2.7	174 25.3	60 0

Tabelle 8: Experimentell bestimmte Kopplungen und berechnete Diederwinkel Φ zu den F-axialen Organophosphaten. Die berechneten Winkel zeigen klar, dass in Lösung der Doppelsessel vorliegen muss.

Die $^3J(P,H_B)$ sind bei allen drei Verbindungen um die 25 Hz ($\Phi \approx 180^\circ$), die Kopplungen mit H_A zwischen 1-3 Hz ($\Phi \approx 60^\circ$) und diejenigen mit H_C sind ~ 0

($\Phi \approx 60^\circ$). Die $^3J(\text{P},6)$ von 1.6 Hz bei (\pm)-**20ax** konnte aus dem ^1H -NMR Spektrum herausgelesen werden; sie ist im ^{31}P -NMR Spektrum nicht aufgelöst. Das ^{31}P -NMR Spektrum kann mit den im ^1H -NMR Spektrum gefundenen Kopplungen genau simuliert³⁴ werden (*line broadening factor* (*lb*) = 5). Wenn in der Simulation die $^3J(\text{P},6)$ fehlt, dann werden die Peaks zu schmal. Die Kopplungen in (+)-**8ax** konnten mit einem $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ -korrelierten Spektrum zugeordnet werden.

5.7.4 Konformationsanalyse der F-equatorialen Organophosphate

Die Konformationsanalyse der F-equatorialen Verbindungen ist einiges schwieriger und weniger eindeutig als im Fall der F-axialen Verbindungen. Die sterischen und stereoelektronischen Effekte wirken nicht mehr miteinander auf eine Stabilisierung des Doppelsessels hin, sondern arbeiten nun gegeneinander. Sterisch wäre weiterhin der Doppelsessel (**Sessel-1**) am günstigsten, doch der anomere Effekt zwingt das F-Atom in eine pseudo-axiale Position.

In **Tabelle 9** sind Modelle der möglichen Konformationen mit pseudo-axialem Fluoratom aufgelistet. Die Modelle entsprechen nicht der Realität, weil der Einfachheit halber mit Decalinen mit gleich langen Bindungen innerhalb des Bicyclus gerechnet wurde. Die effektiven Kovalenzradien der Atome sind aber doch recht unterschiedlich ($r_{\text{P}} = 106$ pm, $r_{\text{C}} = 77$ pm, $r_{\text{O}} = 73$ pm). Zudem ist der Phosphor ein pentavalentes Zentrum und liegt nicht exakt tetraedrisch vor (dsp^3 -Hybridisierung). Die Winkel der Modelle weichen deshalb von den reellen Winkeln in den Kristallstrukturen ab. Als Gedankenstütze für die Zuordnung von Konformationen anhand von experimentellen Daten sind die Modelle in jedem Fall ausreichend.

Man geht davon aus, dass der Piperidinring resp. der carbocyclische Ring aufgrund der Sterik und des Fehlens eines anomeren Effektes immer in der Sessel-Konformation vorliegt. Diese Annahme ist bei den *trans*-Verbindungen sicherlich

³⁴ Die Simulationen wurden mit der Software TOPSPIN[®] Version 2.0 (BRUKER NMR Software) durchgeführt.

richtig. Bei den *cis*-Decalinen, die im Allgemeinen viel flexibler sind als die *trans*-Decaline, können zusätzlich beide Ringe vollständig invertieren.

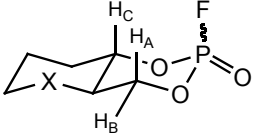
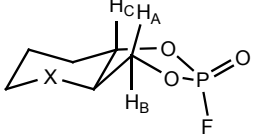
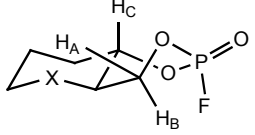
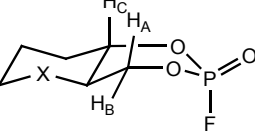
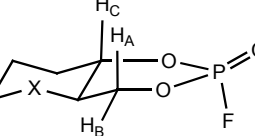
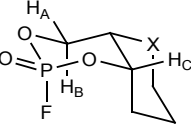
		H_A	H_B	H_C
 <p>Sessel-1</p>	Φ [°] (Modell) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (K _{ARPLUS})	60 0.9	180 25.5	60 0.9
 <p>TB-1</p>	Φ [°] (Modell) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (K _{ARPLUS})	60 0.9	180 25.5	180 25.5
 <p>TB-2</p>	Φ [°] (Modell) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (K _{ARPLUS})	180 25.5	60 0.9	60 0.9
 <p>Wanne</p>	Φ [°] (Modell) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (K _{ARPLUS})	120 10.3	120 10.3	120 10.3
 <p>Envelope</p>	Φ [°] (Modell) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (K _{ARPLUS})	90 2.1	150 20.7	90 2.1
 <p>Sessel-2</p>	Φ [°] (Modell) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (K _{ARPLUS})	180 25.5	60 0.9	180 25.5

Tabelle 9: Mögliche Konformationen der Organophosphate ($X = \text{CH}_2$, N-Bn) mit passender Nomenklatur. Die Torsionswinkel Φ wurden aus Modellen abgeleitet und die Kopplungen mittels modifizierter K_{ARPLUS}-Gleichung 8 berechnet.

Die vollständige Invertierung der beiden Ringe bei den *cis*-Decalinen führt dazu, dass

die equatorialen Substituenten in sterisch ungünstige axiale Positionen und umgekehrt die axialen Substituenten in sterisch günstigere equatoriale Positionen zu liegen kommen. Bei den carbocyclischen Decalinen ist dies kein Problem, da kein zusätzliches Heteroatom (substituierter Stickstoff) vorliegt. Bei den 7-Aza-Verbindungen würde die *N*-Benzylgruppe in eine ungünstige axiale Position zu liegen kommen. Das könnte aufgrund von sterischen Abstossungen dazu führen, dass der Piperidinring in eine *Twist-Boat*-Konformation ausweicht. Eine andere Möglichkeit wäre die Piperidininversion, wobei die Benzylgruppe wieder in die günstige equatoriale Position gebracht wird. Was genau passiert, hängt aber davon ab, wie gross der Energiegewinn durch die strukturellen Änderungen ist und wie gross die Aktivierungsenergie für die Inversion am Stickstoff im Vergleich zum Energiegewinn ist.

5.7.5 Konformationsanalyse der F-equatorialen *trans*-Verbindungen

FUREGATI hatte in seiner Dissertation für das F-equatoriale *trans*-Fluoridat ((±)-**5eq**) eine **TB-2**-Konformation in der Kristallstrukturanalyse gefunden. Die Kopplungen im NMR-Spektrum waren nicht eindeutig in Bezug auf die Konformation in Lösung. Er könnte lediglich die **TB-1**, die **Wannen**- und **Envelope**-Konformation (vgl. **Tabelle 9**, S. 93) ausschliessen. Er konnte mittels Tieftemperatur ¹H-NMR Experimenten in CH₂Cl₂ die Vermutung erhärten, dass bei dieser Verbindung ein Gleichgewicht zwischen **TB-2** und **Sessel-1** vorliegt. Nach der Methode von GORENSTEIN [113] berechnete er anhand der gemessenen ³*J*(P,H_B)_{obs.} mit der **Gleichung 9** die Populationen der **Sessel-1**- (P_{Sessel}) resp. **TB-2**-Konformation (P_{TB}).

$$P_{TB} = \frac{{}^3J(P, H_B)_{Sessel} - {}^3J(P, H_B)_{obs.}}{{}^3J(P, H_B)_{Sessel} - {}^3J(P, H_B)_{TB}} \quad (9)$$

$^3J(\text{P},\text{H}_\text{B})_{\text{Sessel}}$ repräsentiert die Kopplung, bei der 100% Sesselkonformation vorliegt (aus ^1H -NMR, 25.4 Hz [2]) und $^3J(\text{P},\text{H}_\text{B})_{\text{TB}}$ diejenige, bei der 100% **TB-2**-Konformation vorliegt (aus *X-Ray* via $\text{KARPLUS-Gleichung 8}$, 4.2 Hz [2]).

Anhand dieses Modells wurde festgestellt [113], dass bei 293 K ($^3J(\text{P},\text{H}_\text{B})_{\text{obs.}} = 8.3$) *ca.* 81% **TB-2** in Lösung vorliegt. Über $\Delta G = -RT \ln K$ liess sich eine Energiedifferenz der beiden Konformationen von 3.5 kJ/mol zugunsten des **TB-2** berechnen. Je tiefer die Temperatur gesetzt wurde, desto stabiler wurde die *Twist-Boat*-Konformation. Mit sinkender Temperatur nimmt $^3J(\text{P},\text{H}_\text{B})_{\text{obs.}}$ stetig ab, sodass bei 213 K $^3J(\text{P},\text{H}_\text{B})_{\text{obs.}} = 5.2$ ist, was auch die erhaltene Kristallstruktur erklärt[2][75].

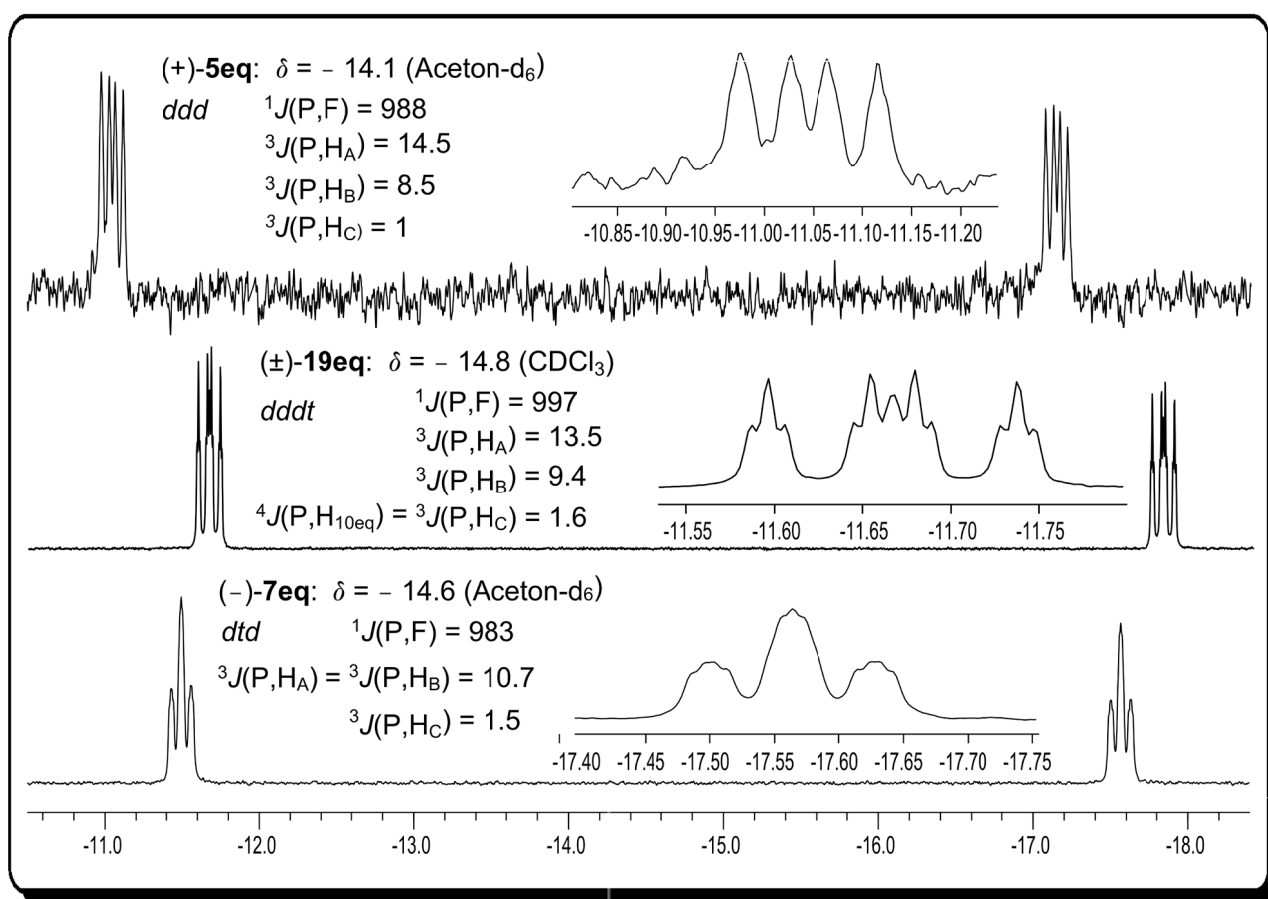


Abbildung 37: ^{31}P -NMR Spektren der *F*-equatorialen *trans*-Organophosphate, 161.9 MHz, 300 K.

(-)-**5eq**³⁵ wurde nicht mit Röntgenstrukturanalyse untersucht. Doch die Kopplungen

³⁵ Es wird immer nur ein Enantiomer genannt, da die Resultate der Kristallstrukturanalysen, bezüglich der Konformationen, für die jeweiligen enantiomeren Paare identisch sind.

entsprechen, obwohl in Aceton-d₆ gemessen, mit $^3J(\text{P},\text{H}_\text{A}) = 14.5$, $^3J(\text{P},\text{H}_\text{B}) = 8.5$ und $^3J(\text{P},\text{H}_\text{C}) \approx 1$ (aus ^1H -NMR) den Ergebnissen von FUREGATI, weshalb man für diese Verbindungen von einer **TB-2**-Konformation in Lösung ausgehen kann. Das gleiche gilt für (\pm)-**19eq**, was aus der *Tabelle 10* zu entnehmen ist. Dort ist sehr schön zu sehen, dass der Anteil (nach *Gleichung 9*) an **TB-2** beim Organophosphat im polaren Lösungsmittel Aceton grösser ist als beim Organophosphat in Chloroform. Dies entspricht den Beobachtungen in [113].

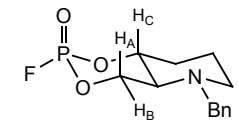
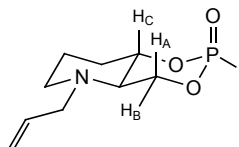
			H _A	H _B	H _C
	(+)- 5eq	Φ [°] (K _{ARPLUS}) $^3J(\text{P},\text{H})$ [Hz] (NMR, Aceton-d ₆)	132 14.5	115 8.5	86 ~1.5
	(\pm)- 19eq	Φ [°] (K _{ARPLUS}) $^3J(\text{P},\text{H})$ [Hz] (NMR, CDCl ₃)	129 13.5	118 9.4	87 1.6

Tabelle 10: Die experimentell bestimmten Kopplungen ergeben via modifizierter K_{ARPLUS}-Gleichung Diederwinkel, die auf ein **TB-2** schliessen lassen.

Bei ($-$)-**7eq** erhielt man auch eine Art *Twist-Boat*-Konformation aus der Kristallstruktur (vgl. *Abbildung 33* rechts, S. 85), die jedoch, wenn man die Diederwinkel Φ betrachtet, schon fast in eine **Wannen-** oder **Envelope**-Konformation überzugehen scheint. Es ist also schon aufgrund der Kristallstruktur schwierig zu entscheiden, welche Konformation vorliegt. Da die Kristallstruktur von LINDEN jedoch als *distorted Screw-Boat* (vgl. S. 243, sehr ähnlich einem *Twist-Boat*) beschrieben wurde, wird die Konformation der Kristallstruktur fortan als **TB-2** bezeichnet.

An den Werten der *Tabelle 11* kann man erkennen, dass die Kopplungen aus dem NMR-Experiment mit den nach der Kristallstruktur berechneten Kopplungen sehr gut übereinstimmen, was den Schluss zulässt, dass die Konformation in Lösung der Kristallstruktur sehr ähnlich ist. Wenn **TB-2**, wie im Fall von FUREGATI, die stabilere

Konformation ist als der **Sessel-1**, dann müsste die $^3J(\text{P},\text{H}_\text{B})$ -Kopplung mit abnehmender Temperatur zunehmen. Die Kopplung müsste sich dann bei *ca.* 12 Hz einpendeln. Steigt sie jedoch bis auf 25 Hz an, dann wäre die Sesselkonformation das globale Minimum nach $\Delta G = -RT \ln K$.

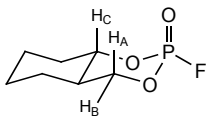
			H _A	H _B	H _C
	(-)-7eq	Φ [°] (<i>X-Ray</i> - TB-2)	118	124	93
		$^3J(\text{P},\text{H})$ [Hz] (K _{ARPLUS})	9.6	11.7	2.6
		Φ [°] (K _{ARPLUS})	121	121	86
		$^3J(\text{P},\text{H})$ [Hz] (NMR, Aceton-d ₆)	10.7	10.7	~ 1.5

Tabelle 11: Konformationen von **(-)-7eq** in Lösung.

Es wurden ^1H - und ^{31}P -NMR Experimente bei 300 K, 263 K und 213 K durchgeführt. Die theoretisch erwartete Änderung der Kopplung $^3J(\text{P},\text{H}_\text{B})$ konnte nicht beobachtet werden. Dies kann man damit erklären, dass in Lösung die stabilste Konformation (in diesem Fall **TB-2**) schon bei 300 K zum grössten Teil (> 95%) vorliegt. Wäre das nicht der Fall, so müsste man im Tieftemperatur-NMR-Experiment nach [113] eine Veränderung der Kopplung sehen. Die Abweichungen der berechneten Kopplungen von den gemessenen liegen innerhalb des Fehlers der Berechnung (vgl. **Abbildung 35**, S. 90). Man kann also bei den *trans*-equatorialen carbocyclischen Decalinen von einer *Twist-Boat*-Konformation in Lösung ausgehen, welche auch gleichzeitig das globale Minimum darstellt.

5.7.6 Konformationsanalyse der F-equatorialen *cis*-Verbindungen

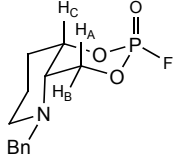
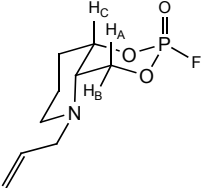
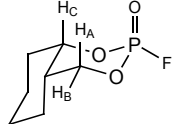
			H _A	H _B	H _C
	(+)-6eq	Φ [°] (<i>X-Ray</i> - Envelope [75]) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (KARPLUS) Φ [°] (KARPLUS) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (NMR, Aceton-d ₆)	88 1.8 130 14.0	157 22.6 122 10.9	94 2.8 127 12.8
	(±)-20eq	Φ [°] (KARPLUS) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (NMR, CDCl ₃)	133 15.0	119 9.9	131 14.2
	(-)-8eq	Φ [°] (<i>X-Ray</i> - Sessel-2) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (KARPLUS) Φ [°] (KARPLUS) $^3J(\text{P,H})$ [Hz] (NMR, Aceton-d ₆)	178 25.5 139 17.0	64 0.6 112 7.7	158 22.8 133 14.8

Tabelle 12: Experimentell bestimmte Kopplungen und berechnete Diederwinkel Φ der F-equatorialen *cis*-Organophosphate.

Die gemessenen $^3J(\text{P,H})$ -Kopplungen von (+)-**6eq** passen nicht mit den berechneten zusammen (**Tabelle 12**). Aufgrund der hohen Flexibilität der *cis*-Decaline kommen mehrere Konformationen in Lösung in Frage. Neben den im Zusammenhang mit den *trans*-equatorialen Decalinen schon erwähnten, kommt hier mit dem **Sessel-2** eine weitere Konformation ins Spiel. Die gemessenen Kopplungen lassen vermuten, dass die verschiedenen Konformationen alle gleichzeitig nebeneinander in Lösung existieren und sich im NMR-Experiment ein Mittelwert aller möglichen Kopplungen der einzelnen Konformationen zeigt (siehe **Abbildung 38**³⁶).

Berechnungen von FUREGATI [2][75] haben ergeben, dass in Lösung **Sessel-1**, **Sessel-2**, **TB-2** und **Envelope** im Gleichgewicht nebeneinander vorliegen³⁷. Die Frage ist

³⁶ Die Kopplungen der gezeigten Verbindungen wurden mittels diverser NMR-Experimente ($^{31}\text{P}/^1\text{H}$ -HMQC, $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$, $^{31}\text{P}\{\text{H-C}(1)\}$, $^{31}\text{P}\{\text{Hax-C}(5)\}$) und durch Simulationen²⁵ der Spin-Systeme bestimmt.

³⁷ Die **Wannen**- und **TB-1**-Konformation konnten durch die Berechnungen ausgeschlossen werden.

nur: welche Konformation liegt mit welchem Anteil vor?

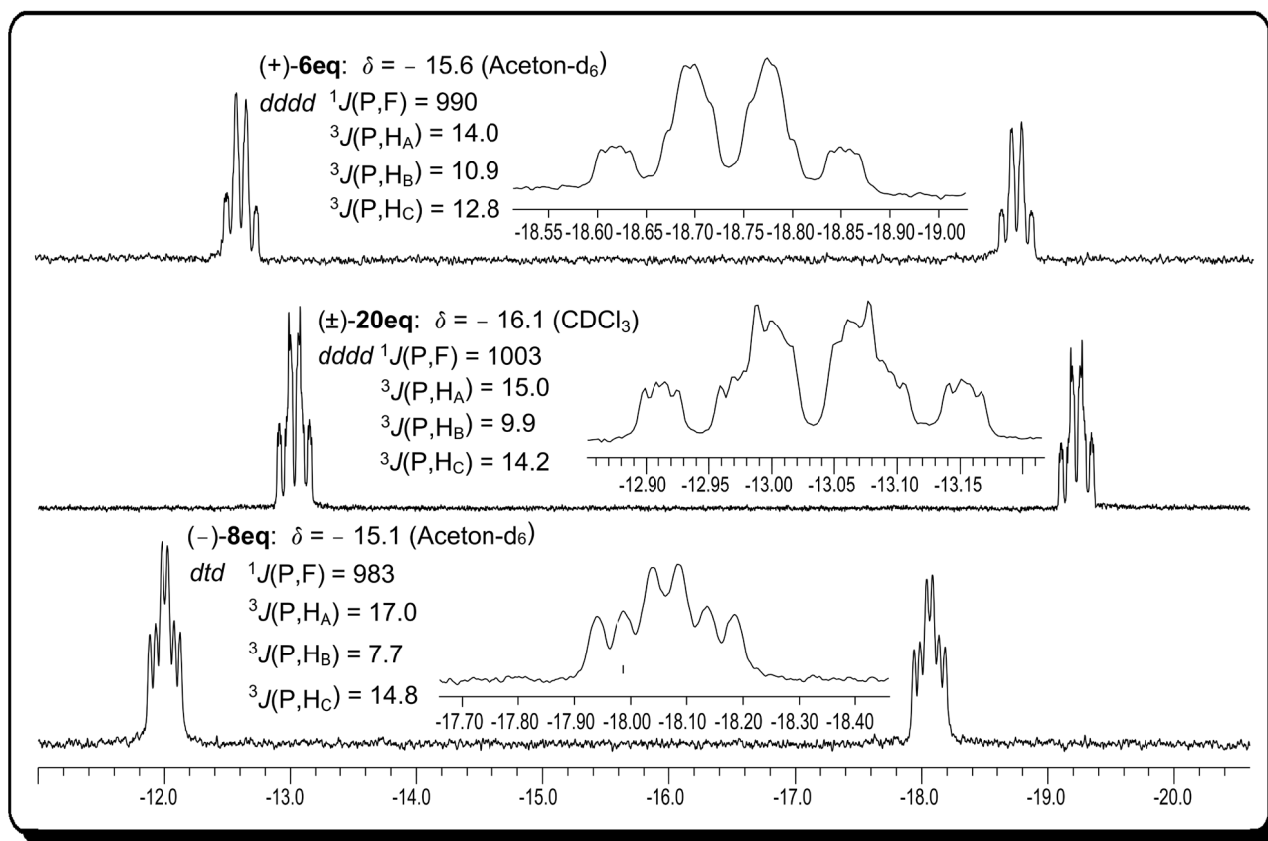
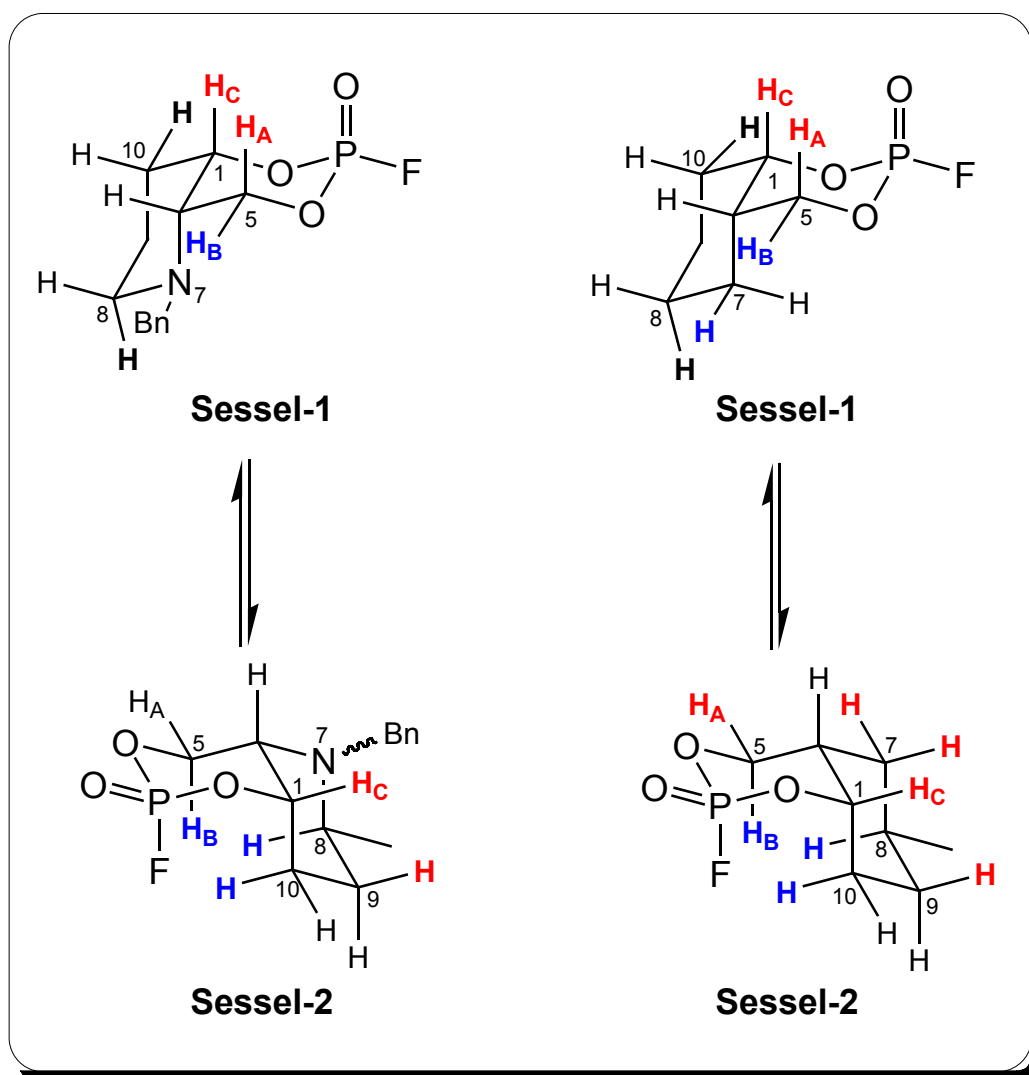


Abbildung 38: ^{31}P -NMR Spektren der *cis-equatorialen Organophosphate*³⁶.

Man kann sich vorstellen, dass die Konformation mit dem grössten Anteil in Lösung das Aussehen des gemessenen Kopplungsmusters am meisten prägt. Wenn man nun die Kristallstruktur von (-)-**8eq** (S. 84) betrachtet, welche den **Sessel-2** (doppelt umgeklappt aus **Sessel-1**) repräsentiert, so kann man in den gemessenen $^3J(P,H)$ -Kopplungen eine Tendenz feststellen: Von der sterisch relativ ungünstigen, jedoch stereoelektronisch begünstigten **Sessel-2**-Konformation scheint bei den carbocyclischen *cis*-equatorialen Decalinen ein genügend grosser Anteil in Lösung vorhanden zu sein, sodass diese Konformation bei beiden enantiomeren Verbindungen unabhängig voneinander auskristallisierte. Man kann also annehmen, dass die Konformation innerhalb von 3 kcal/mol über dem globalen Minimum liegt. Bei den 7-Aza-Verbindungen kristallisierte nicht der **Sessel-2** aus, sondern die **Envelope**-Konformation. Man kann annehmen, dass der Substituent am Stickstoff

einen grossen Einfluss auf die Flexibilität der Verbindungen hat und das doppelte Umklappen einschränkt oder gar ganz verhindert. Klappen die 7-Aza Verbindungen doppelt um, dann steht die Gruppe axial, was sterisch eher ungünstig ist. Je grösser der Substituent, desto grösser die sterische Hinderung und desto unwahrscheinlicher der **Sessel-2**.



Schema 27: Darstellung der doppelten Inversion von **Sessel-1** zu **Sessel-2**. Die Wasserstoffe mit der gleichen Farbe kommen sich in der entsprechenden Konformation genug nahe für einen NOE. Die fett (schwarz) gezeichneten Wasserstoffe an C(10) und C(8) zeigen mit **H_B** keinen NOE im **Sessel-1**.

Man kann an den gemessenen Kopplungen in **Tabelle 12** die Tendenz ausmachen, dass sich die Kopplungen vom grösseren Benzyl zum kleineren Allyl in Richtung

Sessel-2 verschieben. $^3J(\text{P},\text{H}_\text{A})$ und $^3J(\text{P},\text{H}_\text{C})$ nehmen zu, während $^3J(\text{P},\text{H}_\text{B})$ abnimmt. Noch deutlicher wird diese Tendenz, wenn man die Kopplungen von **(-)-8eq** betrachtet.

Bei den 7-Aza Verbindungen scheint also der **Sessel-2** trotz des Substituenten am Stickstoff nicht ausgeschlossen. Dies kann damit zusammenhängen, dass das Stickstoffatom umklappen kann und die sterische Hinderung dadurch abgebaut wird oder der Piperidinring durch Umklappen in eine *Twist-Boat*-Konformation den *N*-Substituenten so aus der ungünstigen axialen Position wegdreht. Wenn der **Sessel-2** in Lösung vorhanden ist, dann sollte man das mittels NOESY-Experimenten nachweisen können. Klappt der Sessel doppelt um, zum **Sessel-2**, so kommt der Wasserstoff **H_B** den Wasserstoffen $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(10)^{32}$ und $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(8)^{32}$ so nahe³⁸, dass ein NOE sichtbar sein muss, wenn die Konformation genug lange stabil resp. die Konformation mit einem Anteil von mindestens 5% in Lösung vorliegt (siehe **Schema 27**).

Im **Sessel-1** beeinflussen sich **H_B** und die Wasserstoffe $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(10)$ und $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(8)$ nicht, weil sie in entgegengesetzte Richtungen zeigen, was im 2D-**Schema 27** leider nicht sehr gut ersichtlich ist. Im **Schema 27** sind zudem aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Doppelsessel gezeichnet. Es sind jedoch wegen der hohen Flexibilität des Moleküls aber auch Konformationen als eine Mischung aus *Twist-Boat*- und Sesselkonformationen in Lösung anzunehmen. Wenn man sich ein Modell macht und die verschiedenen Kombinationen von *Twist-Boat*- und Sesselkonformationen betrachtet, sieht man sofort, dass sich immer entweder **H_B** und $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(10)$ oder **H_B** und $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(8)$ für einen NOE's genügend nahe kommen. Auch wenn der **Sessel-1** nicht ganz doppelt umklappt, sollten die NOE's also sichtbar sein.

Tatsächlich sieht man in den NOESY-Spektren die NOE's zwischen **H_B** und $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(10)$ und $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(8)$.

Die NOESY-Spektren wurden in Benzol aufgenommen, da das Acetonsignal die wichtigen Signale überlagert. Die Signale mussten jeweils mittels COSY- und $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -

³⁸ NOE-Signale bauen sich im Vergleich zu skalaren Kopplungen nur sehr langsam auf und ab. Man kann daher alle NOE's der in Lösung mit mind. 5% vorliegenden Konformationen sehen. Skalare Kopplungen bauen sich schneller auf und ab. Man sieht daher nur Mittelwerte. Die NOE-Signalstärke ist proportional zu $1/r^6$. Also nur bei Kontakten mit kurzer Distanz (2.5 - 3.5 Å) ist überhaupt ein NOE zu sehen.

HSQC-Spektren zugeordnet werden. In Benzol- d_6 werden, verglichen mit den chemischen Verschiebungen in Aceton- d_6 , alle Protonen stark hochfeld-verschoben.

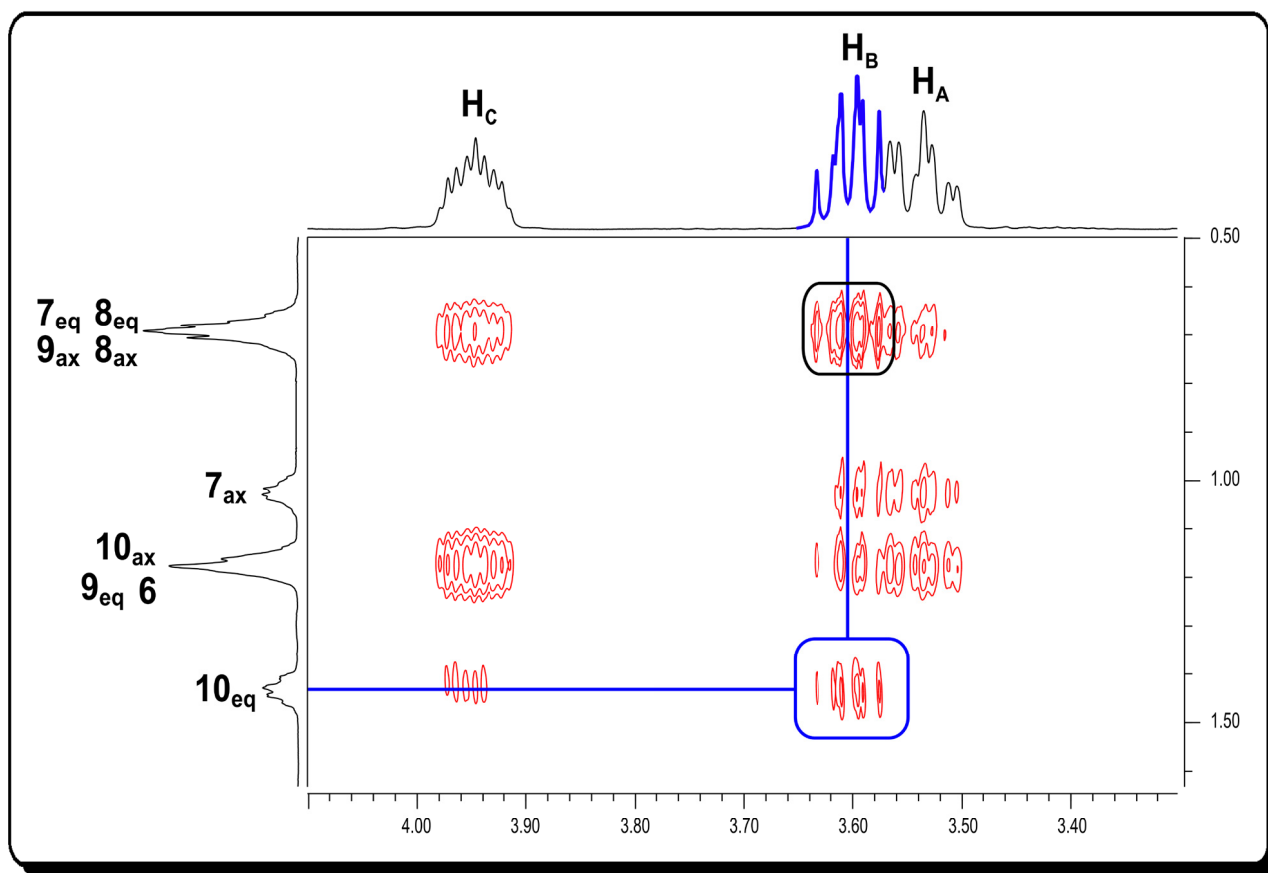


Abbildung 39: NOESY-Spektrum von (+)-**8eq** (300 K, Benzol- d_6). Der blau eingekreiste crosspeak zeigt den NOE von H_{eq} -C(10) mit H_B , der nur im **Sessel-2** oder verwandten Sessel-Twist-Boat-Konformationen vorkommen kann. Im schwarzen Kreis sieht man die crosspeaks von H_{eq} -C(8) und H_{eq} -C(7), die sich überlagern.

Das H-C(6) in (–)-**8eq** wird besonders stark hochfeld-verschoben, wohingegen sich das H_{eq} -C(10) praktisch nicht verschiebt. Daher ist das Signal des H_{eq} -C(10) im Benzolspektrum gegenüber dem H-C(6) tieffeld-verschoben. In Aceton- d_6 ist das genau umgekehrt. Die Wasserstoffe an C(7) haben in Aceton- d_6 vergleichbare chemische Verschiebungen (H_{eq} -C(7) ist leicht tieffeld-verschoben gegenüber H_{ax} -C(7)). In Benzol hingegen wird H_{ax} -C(7) deutlich weniger abgeschirmt als H_{eq} -C(7) und ist deshalb in Benzol- d_6 tieffeld-verschoben gegenüber H_{eq} -C(7). Dies kann durch die NOESY-Spektren eindeutig bestimmt werden. H_{ax} -C(7) kann aufgrund der

Konfiguration des *cis*-Decalins keinen NOE mit \mathbf{H}_C haben und das tieffeldverschobene Signal hat keinen NOE mit \mathbf{H}_C .

Bei (–)-**8eq** stört der NOE von $H_{eq}\text{-C}(7)$ mit \mathbf{H}_B im **Sessel-1** (*Abbildung 39*, schwarz eingekreist). Der *crosspeak* überlagert leider denjenigen von $H_{eq}\text{-C}(8)$ ³⁹ mit \mathbf{H}_B im **Sessel-2**. Da man aber aufgrund der Kristallstruktur von (–)-**8eq** davon ausgehen kann, dass dieser NOE in Lösung existieren muss, ist dies nicht weiter tragisch. \mathbf{H}_A und \mathbf{H}_B zeigen zudem mit beiden $H_2\text{-C}(7)$ einen NOE. Dies ist aber nur möglich, wenn in Lösung verschiedene *Twist-Boat-Twist-Boat*-Kombinationen vorliegen. Dies bestätigt die Annahme von oben, dass nicht nur die Doppelsessel bei 300 K in Lösung vorliegen. Eigentlich sieht man jeden NOE von jeder möglichen Konformation. Der NOE zwischen \mathbf{H}_B und $H_{eq}\text{-C}(10)$ kann jedoch eindeutig zugeordnet werden, was zusammen mit dem Resultat aus der Röntgenstrukturanalyse die Schlussfolgerung zulässt, dass beim *cis*-equatorialen carbocyclischen Organophosphat auch in Lösung ein beträchtlicher Anteil der Verbindung als **Sessel-2** vorliegt.

Tieftemperatur-NMR Experimente (siehe *Tabelle 13*⁴⁰, S. 105) haben dann schliesslich den Beweis erbracht, dass die **Sessel-2**-Konformation das globale Minimum ist. Es wurden ^1H - und ^{31}P -NMR Experimente in Aceton- d_6 bei 300 K, 263 K, 213 K und 193 K durchgeführt. Dabei konnte man sehen, wie sich das Aussehen des Kopplungsmusters immer mehr in Richtung **Sessel-2**-Konformation (vgl. Kopplungen aus *Tabelle 9*, S. 93) veränderte (*Abbildung 40*).

Die Signale von \mathbf{H}_C und \mathbf{H}_B haben während des Abkühlens auf 213 K im ^1H -NMR-Spektrum die Plätze getauscht. \mathbf{H}_C ist nun gegenüber \mathbf{H}_B hochfeld-verschoben. Dies deutet daraufhin, dass sich das Gleichgewicht dramatisch auf eine Seite, in diesem Fall zu **Sessel-2**, verschoben hat. Man kann sehen, dass die $^1J(\text{P},\text{F})$ mit abnehmender Temperatur von 983 Hz bei 300 K bis 999 Hz bei 193 K zunimmt. Die $^1J(\text{P},\text{F})$ -

39 Die Zuordnung von $H_{eq}\text{-C}(8)$ konnte auch mittels COSY und ^1H - ^{13}C -HSQC nicht mit absoluter Sicherheit gemacht werden. Doch die Spektren deuten alle darauf hin, dass die gemachte Zuordnung mit hoher Wahrscheinlichkeit zutrifft.

40 Da bei dieser Verbindung bei RT mehrere Gleichgewichte von verschiedenen Konformationen gleichzeitig existieren und nicht, wie bei den *trans*-Verbindungen von FUREGATI [2][75], ein einziges, klar definiertes Gleichgewicht besteht, können aus den Werten der Tabelle keine Populationsberechnungen nach [113] durchgeführt werden.

Kopplung des *cis*-axialen Epimers ist bei 300 K 998 Hz. Die $^1J(\text{P},\text{F})$ -Kopplung von (+)-**8eq** gleicht bei 193 K derjenigen des axialen Epimers, was wiederum die eindeutige Interpretation zulässt, dass eine **Sessel-2**-Konformation vorliegt.

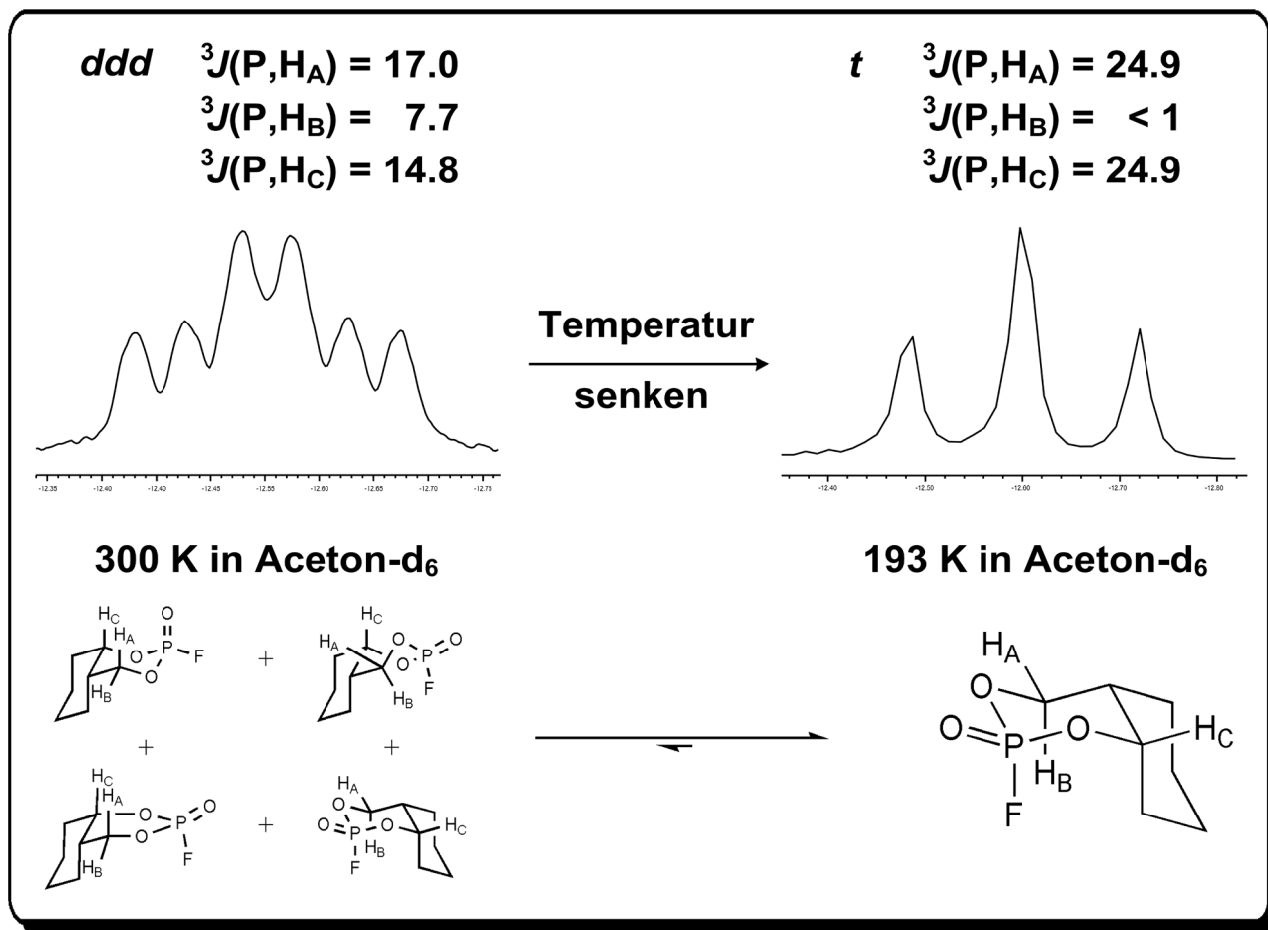


Abbildung 40: ^{31}P -NMR-Tieftemperaturexperiment. Schon bei 213 K ist im ^{31}P -NMR ein klares Triplet zu sehen, welches jedoch um einiges breitere Peaks aufweist als jenes bei 193 K. Es ist jedoch eindeutig, dass die **Sessel-2**-Konformation "ausgefroren" werden kann.

Das ^1H -NMR Spektrum der Verbindung (+)-**6eq** sieht in Benzol- d_6 , bis auf die Signale von $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(9)$ und $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(9)$, in etwa gleich aus wie in Aceton- d_6 . Das ganze Spektrum ist gleichmässig hochfeld-verschoben. Daher war alleine aufgrund der Kopplungsmuster im ^1H -NMR Spektrum die Zuordnung der wichtigsten Signale ($\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(10)$ und $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(8)$) im NOESY-Spektrum möglich. Die Signale der Wasserstoffe an C(9) konnten im NOESY-Spektrum selbst zugeordnet werden, da nur $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(9)$ einen

NOE mit **H_C** (im **Sessel-2**) haben kann.

Temperatur	³ <i>J</i> (P,H) _{obs.} [Hz]		
	H_A	H_B	H_C
300 K (¹ <i>J</i> (P,F) = 983)	17.0	7.7	14.8
263 K (¹ <i>J</i> (P,F) = 987)	18.2 ⁴¹	6.8 ⁴¹	16.8 ⁴¹
213 K (¹ <i>J</i> (P,F) = 998)	24.9 ⁴²	< 1 ⁴²	24.9 ⁴²
193 K (¹ <i>J</i> (P,F) = 999)	24.9 ⁴³	< 1 ⁴³	24.9 ⁴³

Tabelle 13: Resultate aus den Tieftemperatur-NMR Experimenten mit (+)-**8eq**.

Im NOESY-Spektrum kann man die *crosspeaks* von H_{eq}-C(10) und H_{eq}-C(8) mit **H_B** gut anhand des blau eingefärbten äussersten Peaks des Signals von **H_B** identifizieren (siehe **Abbildung 41**). Wie schon oben bei der carbocyclischen Verbindung erwähnt, müssen diese *crosspeaks* nicht zwingend von einer **Sessel-2**-Konformation stammen. Es könnte durchaus eine verwandte Sessel-*Twist-Boat*-konformation sein, die diese NOE's unabhängig in zwei verschiedenen Konformationen zeigt. Für den NOE ist aber zwingend notwendig, dass der Oxaphospharing entweder doppelt umgeklappt oder in einer *Twist-Boat*-konformation ist, also mit dem Fluor in axialer oder pseudo-axialer Position (anomerer Effekt). Für den Piperidinring gilt das Gleiche. Ein Verbleib in der ursprünglichen Sessel-Konformation (**Sessel-1**) würde zu keinem NOE von H_{eq}-C(10) und H_{eq}-C(8) mit **H_B** führen. Das heisst: bei allen

41 Die Werte wurden aus dem ¹H-NMR Spektrum herausgelesen und mit Kopplungssimulationen (MestReC® 4.5.6.0) verglichen. Die Signale im ³¹P-NMR Spektrum waren nicht ausreichend aufgelöst.

42 Die Werte mussten aus dem ³¹P-NMR Spektrum herausgelesen werden, da die Signale im ¹H-NMR Spektrum Koaleszenz zeigten und daher nicht genügend aufgelöst waren. Die drei Peaks des Triplets im ³¹P-NMR waren denn auch etwas breiter als bei 193 K.

43 Diese Werte konnten aus beiden Spektren herausgelesen werden, obwohl das Signal von **H_C** im ¹H-NMR Spektrum immer noch nicht richtig aufgelöst war. Die Lösung war vermutlich bei dieser Temperatur nicht mehr sehr homogen, was schon anhand der Schwierigkeiten beim *shimmen* der NMR-Probe erahnt werden konnte. Trotzdem konnte aufgrund der scharfen Peaks (viel schärfer als bei 213 K) des Triplets im ³¹P-NMR mit gutem Gewissen davon ausgegangen werden, dass **H_C** mit dem Phosphor die gleiche Kopplung hat wie **H_A**. Bei **H_B** war im ¹H-NMR keine grosse Phosphorkopplung zu sehen.

Konformationen, die in **Tabelle 9** (S. 93) dargestellt sind (ausser natürlich beim **Sessel-2**), existieren diese NOE's nicht.

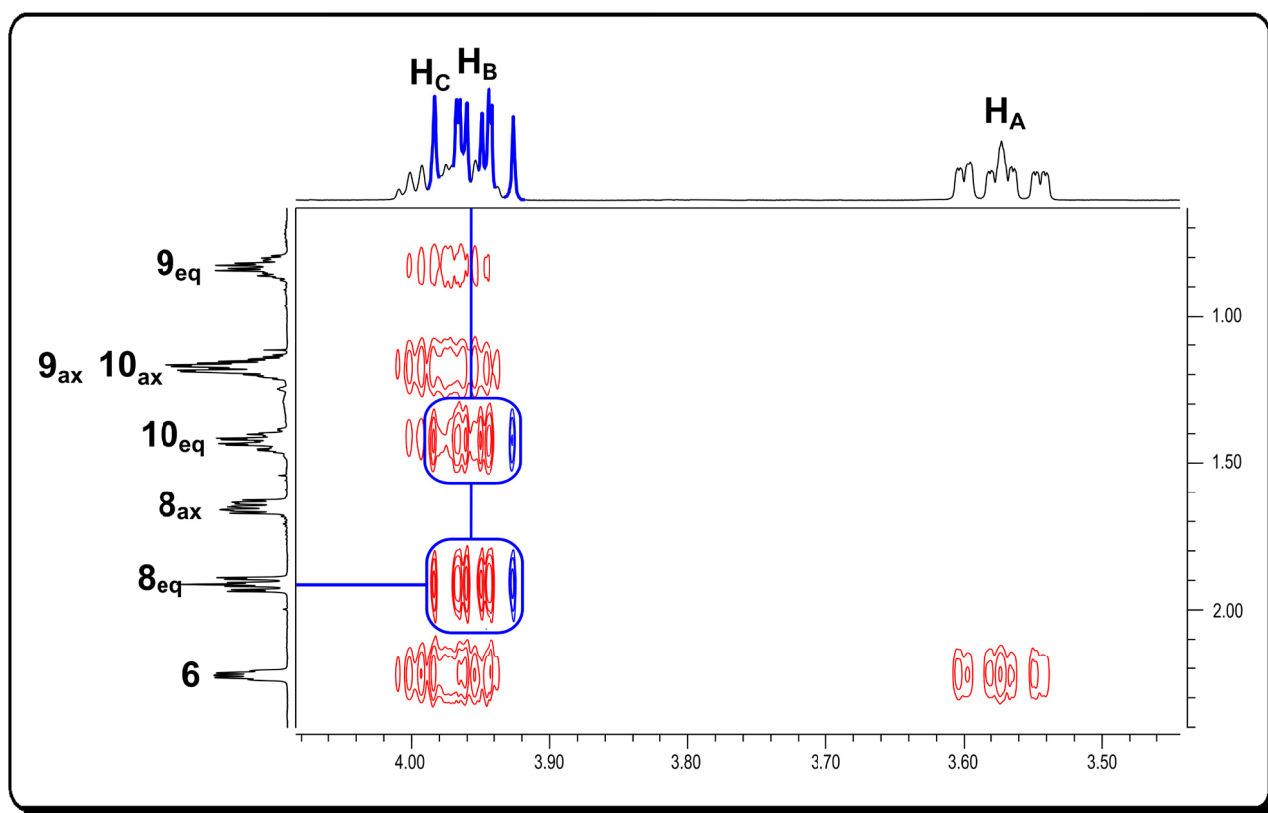


Abbildung 41: NOESY-Spektrum von (+)-**6eq** in Benzol- d_6 (300 K). Die blau eingekreisten crosspeaks lassen vermuten, dass der **Sessel-2** und verwandte Sessel-Twist-Boat-Konformationen trotz des grossen Substituenten am Stickstoff in Lösung existieren.

Anders als bei den carbocyclischen "Verwandten" spielt der Stickstoff als Konformationsanker eine wichtige Rolle. Die Flexibilität des *cis*-Decalins nimmt mit zunehmender Grösse des Substituenten ab, und dementsprechend verändern sich auch die Gleichgewichte in Lösung. Das Gleichgewicht wird sich wahrscheinlich eher von der Seite der **Sessel-2**-Konformation wegbewegen. Welche Konformation aber tatsächlich in Lösung das globale Minimum darstellt, könnten Tieftemperatur-NMR Experimente zeigen, die aus Zeitgründen aber nicht mehr durchgeführt wurden. Die spezielle **Envelope**-Kristallstruktur, die FUREGATI erhalten hat [2][75], und die $^3J(P,H)$ -Kopplungen der Verbindung lassen Vermutungen in alle Richtungen zu.

5.8 Enzymkinetik, Neubeurteilung der kinetischen Mechanismen und der diagnostischen Methoden

Im folgenden Abschnitt wird im Wesentlichen die Arbeit [114] beschrieben, welche in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. ANTONIO BAICI und PATRICIA SCHENKER (Doktorandin) vom Biochemischen Institut der Universität Zürich entstanden ist. Zudem werden die aktuellen Resultate der enzymkinetischen Messungen präsentiert und diskutiert.

5.8.1 Hintergrund

Ganz am Anfang des Forschungsprojektes wurden die Organophosphate nach den Methoden von HART und O'BRIEN [115] und MAIN und DAUTERMAN [116] enzymkinetisch untersucht. Mit diesen Methoden konnte jedoch die Reproduzierbarkeit der Resultate nicht gewährleistet werden.

FUREGATI [2] konnte durch die Verwendung des ELLMAN-*assays* [117] und der Auswertung nach BAICI [118] erste reproduzierbare Resultate generieren. Die Arbeiten von LORENZETTO [70], CLERC [71] und WÄCHTER [1] bestätigten die Reproduzierbarkeit.

Die Betrachtung der nun vollständigen Datensätze führte zu einer grundlegenden Neubeurteilung der kinetischen Mechanismen und diagnostischen Methoden, da sich das kinetische Verhalten der Inhibitoren als komplizierter herausstellte als gemeinhin angenommen. Durch die Verfeinerung des Auswertungsverfahrens konnten detailliertere Einblicke gewonnen werden. Zudem wurden neue Phänomene beobachtet und diagnostisch verarbeitet.

5.8.2 Allgemeines

Die Reaktion von einem Enzym mit einem Substrat und/oder einem Inhibitor ist ein

hoch komplexer Vorgang mit mehreren Gleichgewichten und komplexen Geschwindigkeitskonstanten. In der Tat existiert keine analytische Lösung zur Beschreibung des allgemeinen Falls [118][119]. Trotz dieser inhärenten Komplexität war die Kinetik irreversibler Modifikationen von Enzymen schon früher Gegenstand von diversen Studien. Es wurden mittels diskontinuierlicher Methoden Restenzymaktivitäten nach Präinkubation der Enzyme mit den gewünschten Modifikatoren⁴⁴ bestimmt [120 – 122]. Kontinuierliche Methoden erfreuen sich heutzutage grosser Beliebtheit, da die Verlaufskurven (*progress curves*), welche durch kontinuierliche Aufzeichnung der Produktbildung (dazu wird die Umsetzung eines chromogenen oder fluorogenen Substrats verfolgt), sehr viel Information enthalten [123 – 127].

Instabilität von Modifikatoren und temporäre Inhibition⁴⁵ beeinträchtigen zum einen den praktischen Nutzen von vielen Verbindungen und stellen zum anderen ein Problem für die Interpretation der kinetischen Daten dar. Im Klartext: wenn man eine kontinuierliche Methode mit Verlaufskurven für die Datengewinnung einsetzt, kann es passieren, dass man temporäre Inhibition und Modifikatorinstabilität mit echter Reversibilität verwechselt. Später in diesem Abschnitt wird eine Lösung für dieses Problem anhand eines konkreten Beispiels ausführlich diskutiert⁴⁶.

5.8.3 Theoretische Betrachtung

5.8.3.1 Reversible (*slow-binding*) Inhibition

Um die irreversible Enzyminhibition diskutieren zu können, ist es sinnvoll, zuerst das Verhalten von irreversiblen, langsam bindenden Inhibitoren zu betrachten. In **Schema 28** sind zwei häufige Mechanismen (**2A-R** und **1A-R**) für reversible Inhibitoren

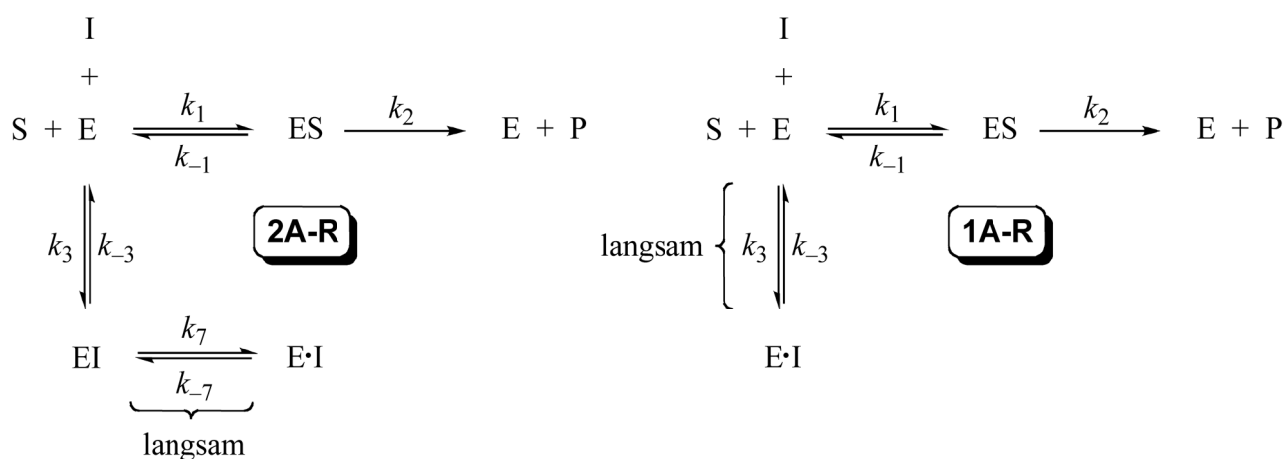
44 Der Begriff "Modifikator" beschreibt Verbindungen, welche mit einem Enzym in irgendeiner Weise eine Reaktion eingehen. Bei dieser Reaktion muss es sich nicht zwingend um eine Inhibition handeln.

45 Es findet eine Inhibition statt, welche aber in kurzer Zeit durch Hydrolyse des Enzym-Inhibitor-Komplexes wieder beendet wird. Freies Enzym kommt dadurch wieder in den Reaktionszyklus.

46 Es werden in der vorliegenden Arbeit nur kompetitive Inhibitoren betrachtet, das heisst, Inhibitoren, welche das freie Enzym binden und nicht den Enzym-Substrat-Komplex.

gezeigt (Zeichenerklärung, siehe **Kapitel 5.8.3.5**, S. 124).

Beim Mechanismus **2A-R** findet eine langsame Produktion eines Enzym-Inhibitor Komplexes (E·I) über ein sich schnell einstellendes Gleichgewicht von E und I zu einem adsorptiven Komplex (EI) statt. Die Nummer **2** im Ausdruck **2A-R** beschreibt also eine Reaktion in zwei Schritten. Der Mechanismus **1A-R** (Reaktion in einem Schritt) ist die degenerierte Form von **2A-R**, bei der die Konzentration von EI keine kinetische Relevanz hat.



Schema 28: Reversible (slow-binding) Enzyminhibition. Die zwei Reaktionstypen stellen die reversiblen (**R** steht für Reversibilität) Verwandten der Mechanismen **2A** und **1A** dar.

Die langsam-bindende, die langsam, fest-bindende Inhibition und irreversible Enzymmodifikation sind zeitabhängige Phänomene. Das heisst, dass das Endprodukt nicht unmittelbar gebildet wird, sondern innerhalb von Minuten oder Stunden. Ungeachtet der physiologischen und pharmakologischen Signifikanz, bietet dieses Verhalten die Möglichkeit, kinetische Parameter zu messen und die entsprechenden Inhibitionsmechanismen zu bestimmen.

Für diese langsamen Prozesse nimmt die integrierte Geschwindigkeitsgleichung (ausgedrückt als Produktkonzentration gegen die Zeit) die allgemeine Form an (vgl. **Gleichung 10, Tabelle 14**). Der Ausdruck v_s repräsentiert die Geschwindigkeit nach dem Erreichen des *steady-state* und v_z (für die Zeit "zero") steht für die Geschwindigkeit bei $t = 0$. Das Symbol v_z wurde für den Fall der langsamen

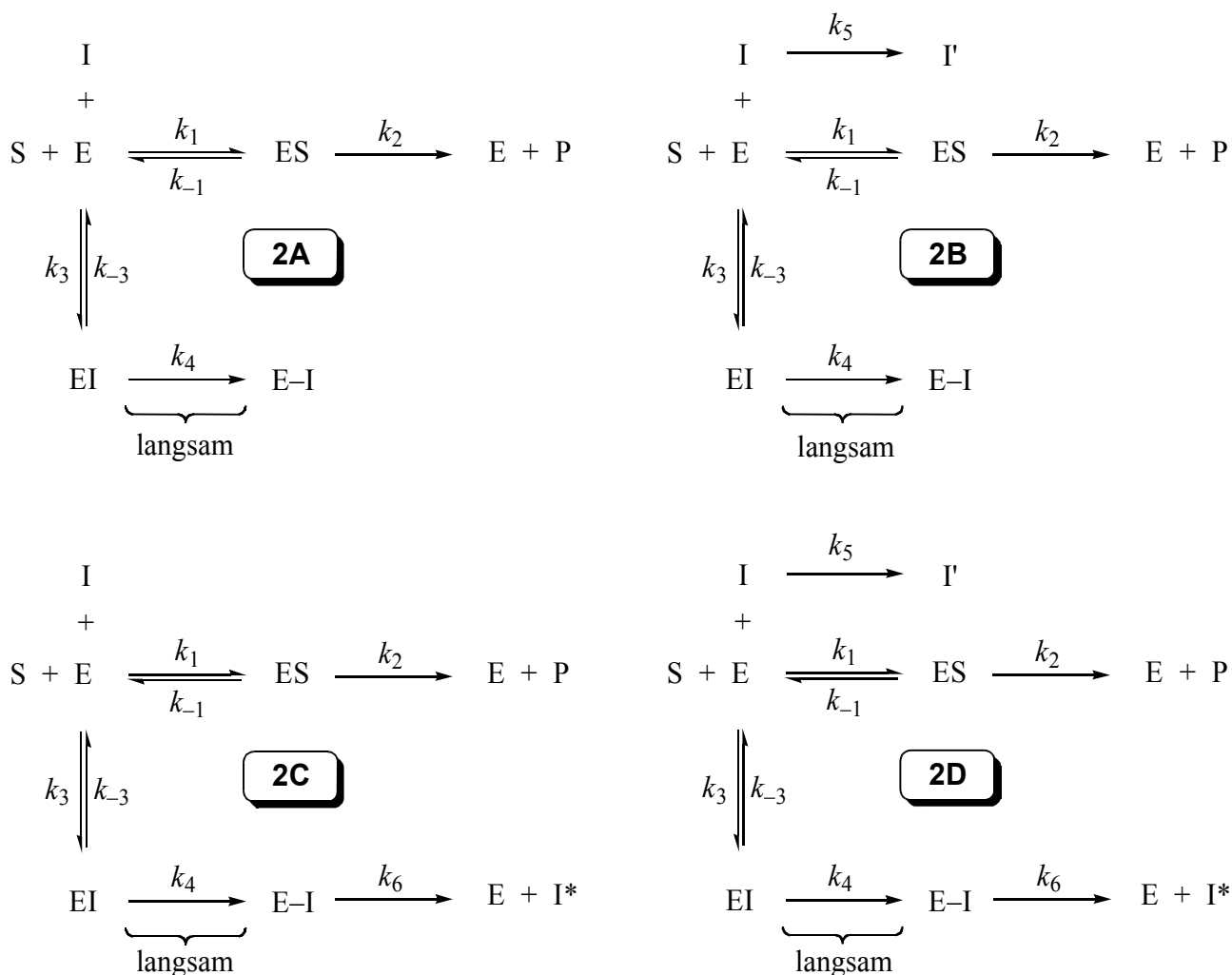
Enzymmodifikation eingeführt, als Unterscheidung von v_0 , welches die Geschwindigkeit ohne Modifikator darstellt (vgl. **Kapitel 5.8.3.5**, S. 124). Je nach den experimentellen Bedingungen und Mechanismen kann v_z grösser oder kleiner als v_s sein und gleich gross oder kleiner als v_0 .

Mechanismus 2A-R	Mechanismus 1A-R
$[P] = v_s t + \frac{(v_z - v_s)(1 - e^{-\lambda t})}{\lambda} + d \quad (10)$	$[P]$ wie Gleichung 10
$\lambda = k_{-7} + \frac{k_7 [I]}{K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) + [I]} \quad (11)$ $K_i = \frac{k_{-3}}{k_3}$	$\lambda = k_{-3} + \frac{k_3 [I]}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (12)$
$v_z = \frac{V[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (13)$	$v_z = v_0 = \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad (14)$
$v_s = \frac{V[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i \left(\frac{k_{-7}}{k_7 + k_{-7}}\right)}\right) + [S]} \quad (15)$	$v_s = \frac{V[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (16)$

Tabelle 14: Gleichungen zu den Mechanismen **2A-R** und **1A-R** (**Schema 28**). Die Ausdrücke von v_z und v_s beziehen sich auf assays, bei welchen die Reaktion durch Zugabe vom Enzym zu einer Lösung von Inhibitor und Substrat gestartet wird.

Die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung λ , welche den Verlauf der Reaktion bis zum *steady-state* beschreibt, hat für jeden Mechanismus einen charakteristischen Ausdruck (vgl. **Gleichung 11**, **Tabelle 14**). Der Parameter d (*displacement*) wurde in **Gleichung 10** (**Tabelle 14**) und anderen Formen dieser Gleichung eingeführt, um dem Fall Rechnung zu tragen, bei dem schon vor dem Start der Reaktion Produkt oder ein dazu proportionales spektroskopisches Signal (welches zu Beginn der Reaktion nicht Null ist) vorhanden ist.

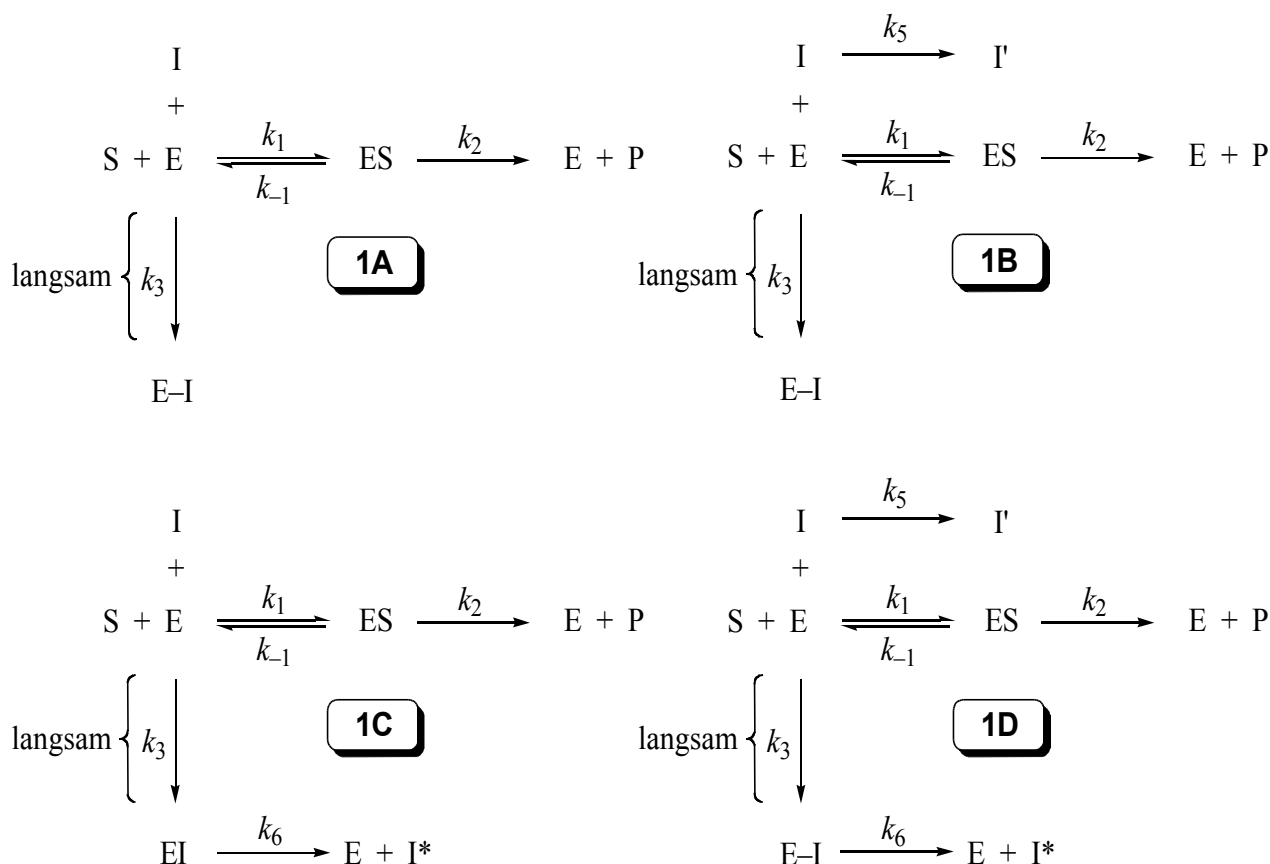
5.8.3.2 Enzyminaktivierung; Irreversible Inhibition⁴⁷



Schema 29: Mechanismen der irreversiblen Enzymmodifikation in zwei Schritten. In den vier Mechanismusvarianten (die Nummer 2 indiziert einen Inhibitionsprozess in zwei Schritten) findet die kovalente Enzymmodifikation (E-I) via der reversiblen Bildung eines absorptiven Komplexes (EI) statt. Mechanismus **2B** beschreibt einen instabilen Modifikator, welcher spontan und nicht-enzymatisch zerfällt. Mechanismus **2C** zeigt temporäre Inhibition, bei welcher das inhibierte Enzym zu freiem Enzym regeneriert wird und gleichzeitig der Inhibitor I in eine inerte Species I* zerfällt. Das regenerierte freie Enzym geht anschliessend wieder in den Reaktionszyklus ein. Mechanismus **2D** illustriert den Fall eines chemisch instabilen Inhibitors, welcher gleichzeitig temporäre Inhibition mit dem Enzym zeigt. I' und I* haben keinen Einfluss mehr auf das Enzym und werden dementsprechend dem System entzogen.

⁴⁷ Der Begriff "Inaktivierung" beschreibt, dass ein beliebiger Modifikator durch kovalente Bindung an ein Enzym dieses in eine Spezies ohne katalytische Aktivität überführt. Der Begriff unterscheidet auf einen Blick zwischen Reversibilität und Irreversibilität. In der vorliegenden Arbeit wurde aber trotzdem meistens der weniger genaue, klassische Ausdruck "irreversibler Inhibitor" gebraucht.

In den meisten Fällen kann die Kinetik von irreversiblen Enzyminhibitionen mit dem Mechanismus **2A** beschrieben werden (**Schema 29**). Der Mechanismus **2A** besteht aus einem sich schnell einstellenden Gleichgewicht zur Bildung eines adsorptiven Komplexes (EI) und einem darauf folgenden langsamen Schritt, bei dem das Enzym irreversibel in ein kovalent modifiziertes Enzym übergeführt (E–I) und dadurch inaktiviert wird.



Schema 30: Mechanismus für die irreversible Enzymmodifikation in einem Schritt. In diesen Mechanismen (die Nummer **1** steht für die Inhibition in einem Schritt) bilden Enzym und Modifikator ein kovalent inhibiertes E–I in einer bimolekularen Reaktion. Der Mechanismus mit instabilem Inhibitor (**1B**), die temporäre Inhibition (**1C**) und die Kombination aus beidem (**1D**) sind Analoge zu den Mechanismen in **Schema 29**.

Die Konzentration des reversiblen adsorptiven Intermediats kann kinetisch unbedeutend werden, wenn die Dissoziationskonstante $K_i = k_{-3}/k_3$ gross ist, verglichen

mit der Konzentration des eingesetzten Inhibitors im Experiment. In diesem Fall degeneriert der Mechanismus **2A** zum Mechanismus **1A** (*Schema 30*). Obwohl es keinen Grund gibt, die beiden Mechanismen im Sinne der chemischen Interpretation der daraus folgenden Werte als unterschiedlich zu bezeichnen (das gleiche gilt für die Mechanismen **2A-R** und **1A-R**), ist die Unterscheidung doch aus praktischer Sicht nützlich und auch mathematisch korrekt.

Mechanismus 2A	Mechanismus 2C
$[P] = \frac{v_z}{\lambda}(1 - e^{-\lambda t}) + d \quad (17)$	$[P] = v_\infty t + \frac{v_z - v_\infty}{\lambda}(1 - e^{-\lambda t}) + d \quad (18)$
$\lambda = \frac{k_4[I]}{K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) + [I]} \quad (19)$ $K_i = \frac{k_{-3}}{k_3}; \quad k_i = \frac{k_4}{K_i}$	$\lambda = k_6 + \frac{k_4[I]}{K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) + [I]} \quad (20)$ $K_i = \frac{k_{-3}}{k_3}; \quad k_i = \frac{k_4}{K_i}$
$v_z = \frac{V[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (13)$	v_z wie für Mechanismus 2A
$v_\infty = 0$	$v_\infty = \frac{V[S]}{K_m \left\{1 + \frac{[I]}{K_i} \left(1 + \frac{k_4}{k_6}\right)\right\} + [S]} \quad (21)$

Tabelle 15: Gleichungen für die Mechanismen **2A** und **2C** (*Schema 29*, S. 111). Die Ausdrücke von v_z und v_∞ beziehen sich auf assays, bei welchen die Reaktion durch Zugabe von Enzym zu einer Lösung von Inhibitor und Substrat gestartet wird.

Oft unterliegen Moleküle, welche als irreversible Modifikatoren von Enzymen hergestellt wurden, spontanem, nicht-enzymatischem Zerfall, meistens durch Hydrolyse zu einer inerten Spezies I' (**2B** (*Schema 29*) und **1B** (*Schema 30*)). Wiederum andere Moleküle agieren als temporäre Modifikatoren. Bei diesem Prozess wird freies Enzym regeneriert und eine inaktive Spezies I* gebildet (**2C** und **1C**). Im schlimmsten Fall kommen bei einem Modifikator beide Eigenschaften zusammen vor

(**2D** und **1D**). Bei echt irreversiblen Prozessen wird die *steady-state* Geschwindigkeit v_s in **Gleichung 10** (**Tabelle 14**, S. 110) Null gesetzt, und die Reaktionsgeschwindigkeit wird daraus folgend durch **Gleichung 17** (**Tabelle 15** oder **Tabelle 16**) ausgedrückt.

Nach unserem besten Wissen wurden in der Literatur noch keine analytischen Ausdrücke im expliziten Stil unserer Arbeit [114] für die temporären Mechanismen **2C** und **1C** publiziert. Das Symbol v_∞ in der **Tabelle 15** ist das Gegenstück zu v_s in **Tabelle 14**. Das Unendlichkeitszeichen bedeutet nichts anderes, als dass diese Geschwindigkeit am Ende der exponentiellen Phase berechnet wird. Den Ausdruck für v_∞ erhält man mathematisch, wenn man im Term $e^{-\lambda t} t = 0$ setzt.

Mechanismus 1A	Mechanismus 1C
$[P] = \frac{v_z}{\lambda} (1 - e^{-\lambda t}) + d \quad (17)$	$[P] = v_\infty t + \frac{v_z - v_\infty}{\lambda} (1 - e^{-\lambda t}) + d \quad (18)$
$\lambda = \frac{k_3 [I]}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (22)$	$\lambda = k_6 + \frac{k_3 [I]}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (23)$
$v_z = v_0 = \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad (14)$	v_z wie für Mechanismus 1A
$v_\infty = 0$	$v_\infty = \frac{V[S]}{K_m \left(1 + \frac{k_3}{k_6} [I] \right) + [S]} \quad (24)$

Tabelle 16: Gleichungen für die Mechanismen **1A** und **1C** (**Schema 30**, S. 112). Die Ausdrücke von v_z und v_∞ beziehen sich auf assays, bei welchen die Reaktion durch Zugabe von Enzym zu einer Lösung von Inhibitor und Substrat gestartet wird.

Eine komplette theoretische Abhandlung der Mechanismen **2B** und **2C** für instabile Inhibitoren ist in [127] publiziert. Im diesem Artikel wird jedoch eine zwar einwandfreie, aber komplizierte mathematische Sprache benutzt, welche für den Anwender ohne besondere mathematische Vorkenntnisse nur schwer zu verstehen ist. Später in dieser Arbeit wird deshalb diese theoretische Abhandlung für den

Mechanismus **1B** zusammengefasst, um konzeptionelle Unterschiede zu den integrierten Geschwindigkeitsgleichungen der Systeme **2A**, **2C**, **1A** und **1B** aufzuzeigen und den Umgang mit instabilen Modifikatoren in der Praxis zu erklären. Die komplexe, integrierte Geschwindigkeitsgleichung für den Mechanismus **2B** wird in dieser Arbeit nicht behandelt, da die Lösung nur unter speziellen Voraussetzungen möglich ist [127].

Im Fall der Mechanismen **2D** und **1D** ist es grundsätzlich fraglich, ob man die untersuchten Verbindungen noch mit gutem Gewissen als Inhibitoren bezeichnen kann. Obwohl es möglich ist, integrierte Geschwindigkeitsgleichungen dieser Mechanismen zu erhalten, ist es mathematisch doch sehr umständlich, und die Resultate sind eher von akademischem, als von praktischem Interesse.

5.8.3.3 Unterscheidung der Mechanismen

Um eine praktische und benutzbare Referenz für diagnostische Zwecke anbieten zu können, wurden von BAICI Verlaufskurven der Mechanismen (siehe *Schemata 28 - 30*) mittels numerischer Integration der entsprechenden Sätze von Differentialgleichungen simuliert⁴⁸. Alle berechneten und experimentellen Kurven, welche im Verlauf dieses Abschnittes gezeigt werden, beziehen sich auf Reaktionen, welche durch Zugabe von Enzym zu einer Lösung von Substrat und Inhibitor gestartet wurden. Die Differentialdiagnose der Mechanismen wird durchgeführt, indem man die Form der Verlaufskurven betrachtet und die Abhängigkeiten von λ und der Geschwindigkeiten v_s , v_z und v_∞ von der Inhibitorkonzentration analysiert.

Die Verlaufskurven der Mechanismen **2A-R** und **1A-R** und die Abhängigkeiten der Parameter λ , v_z und v_s von $[I]$ sind in *Abbildung 42* gezeigt. Die Unterscheidung zwischen **2A-R** und **1A-R** ist einfach, da die Abhängigkeit λ von $[I]$ für den Mechanismus **2A-R** hyperbolisch und für **1A-R** linear ist. Weiter nimmt v_z

⁴⁸ Mit *Matlab-Simulink* Software (www.mathwork.com).

hyperbolisch mit $[I]$ ab (**2A-R**), respektive, ist unabhängig von $[I]$ (**1A-R**). Die jeweiligen kinetischen Konstanten können anhand der Kurve von λ vs. $[I]$ berechnet werden (siehe **Abbildung 42**). Dazu wird die zum Mechanismus passende Gleichung aus den **Tabellen 14 – 16** an die experimentellen Daten angepasst ("gefittet").

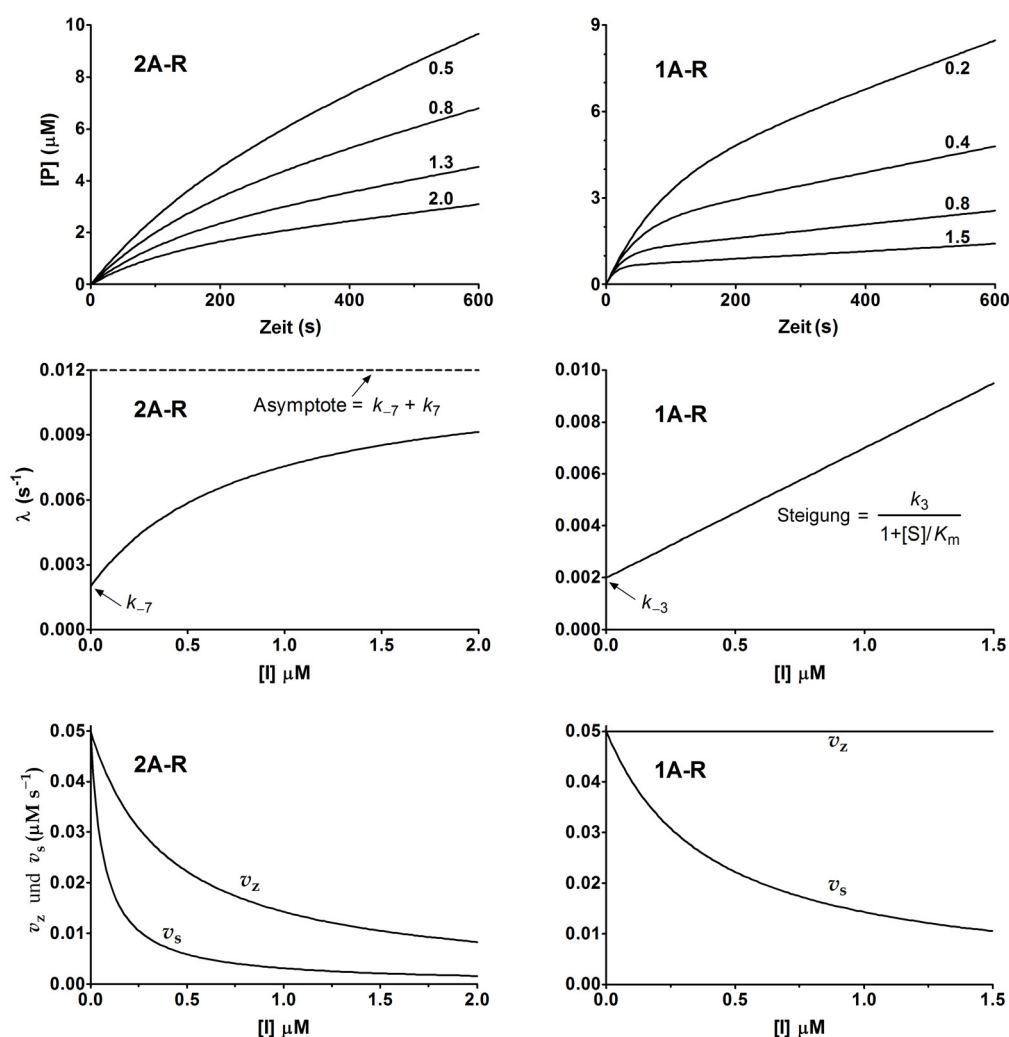


Abbildung 42: Verlaufskurven und diagnostische Parameter der Mechanismen **2A-R** und **1A-R** (**Schema 28**, S. 109). Die Nummern direkt neben den Kurven in den obersten Tafeln stellen die Konzentrationen des Inhibitors (μM) dar, mit welchen simuliert wurde. Die Kurven wurden mit den folgenden Parametern generiert, welche für beide Mechanismen gängig sind: $k_2 = 20 \text{ s}^{-1}$, $[E]_t = 5 \text{ nM}$, $[S] = K_m = 100 \mu\text{M}$. Zusätzliche Parameter für den Mechanismus **2A-R**: $k_3 = 0.5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-3} = 0.2 \text{ s}^{-1}$, $k_7 = 0.01 \text{ s}^{-1}$, $k_{-7} = 0.002 \text{ s}^{-1}$. Zusätzliche Parameter für den Mechanismus **1A-R**: $k_3 = 0.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-3} = 0.002 \text{ s}^{-1}$.

Es ist zu beachten, dass die Anzahl experimenteller Datenpunkte der limitierende Faktor für die Menge an Variablen, die noch mit hoher Genauigkeit "gefittet" werden können, darstellt [128][129]. In unserem Fall heisst das, dass mit fünf Datenpunkten noch zwei Variablen mit ausreichender Genauigkeit "gefittet" werden können. Schon drei Variablen können mit dieser Anzahl Datenpunkten nicht mehr berechnet werden. Bei den Mechanismen **2A-R** und **2C** tritt dieses Problem auf (vgl. **Gleichungen 11** und **20**). Es kann jedoch umgangen werden, indem man K_i jeweils aus der Auftragung von v_z gegen $[I]$ berechnet (**Gleichung 13**) und den erhaltenen Wert für K_i bei der Anpassung an die Kurve λ vs. $[I]$ als Konstante einsetzt.

Aus den Anpassungen der Parameter v_z und v_s können K_i wie auch die *overall* Inhibitionskonstante ($K_i k_7/(k_7 + k_{-7})$) für den Mechanismus **2A-R** berechnet werden und als Kontrolle der internen Konsistenz der Berechnungen verwendet werden.

Mechanismus **2A** für irreversible Inhibition kann unmissverständlich vom Mechanismus **2A-R** unterschieden werden, wenn die Verlaufskurve über einen ausreichend langen Zeitraum gemessen werden kann und somit vollständige Inhibition eintritt. Der irreversible Mechanismus ist durch eine Verlaufskurve charakterisiert, die am Ende der Reaktion parallel zur Zeitachse verläuft und damit indiziert, dass kein *steady-state* mit positiver Steigung existiert (**Abbildung 43**). Zudem ist in diesem Fall der Schnittpunkt mit der Ordinate in der Auftragung λ vs. $[I]$ gleich Null. Für den Mechanismus **2A-R** ist er ungleich Null.

Eine Unterscheidung zwischen den Mechanismen **2C** und **2A-R** ist alleine durch Betrachtung der Verlaufskurven und Analyse der Abhängigkeiten der Parameter von $[I]$ nicht möglich. Im Klartext: die positive Steigung bei v_∞ könnte als *steady-state* eines reversiblen Systems falsch gedeutet werden. In Tat und Wahrheit wird diese Steigung durch das regenerierte freie Enzym verursacht, welches wieder in den Reaktionszyklus eingespeist wird, nachdem der Komplex E-I zerfallen ist. Wie auch immer, durch Präinkubation des Enzyms mit Inhibitor und Starten der Reaktion durch Zugabe von Substrat zu verschiedenen Preinkubationszeiten, ist eine Unterscheidung möglich. Für einen reversiblen Mechanismus hängt die Steigung im *steady-state*

nicht von der Präinkubationszeit ab, während die Steigung beim Mechanismus **2C** mit zunehmender Präinkubationszeit zunimmt. Das entspricht dann der Abnahme der $[I]$, welche mit dem Enzym interagiert.

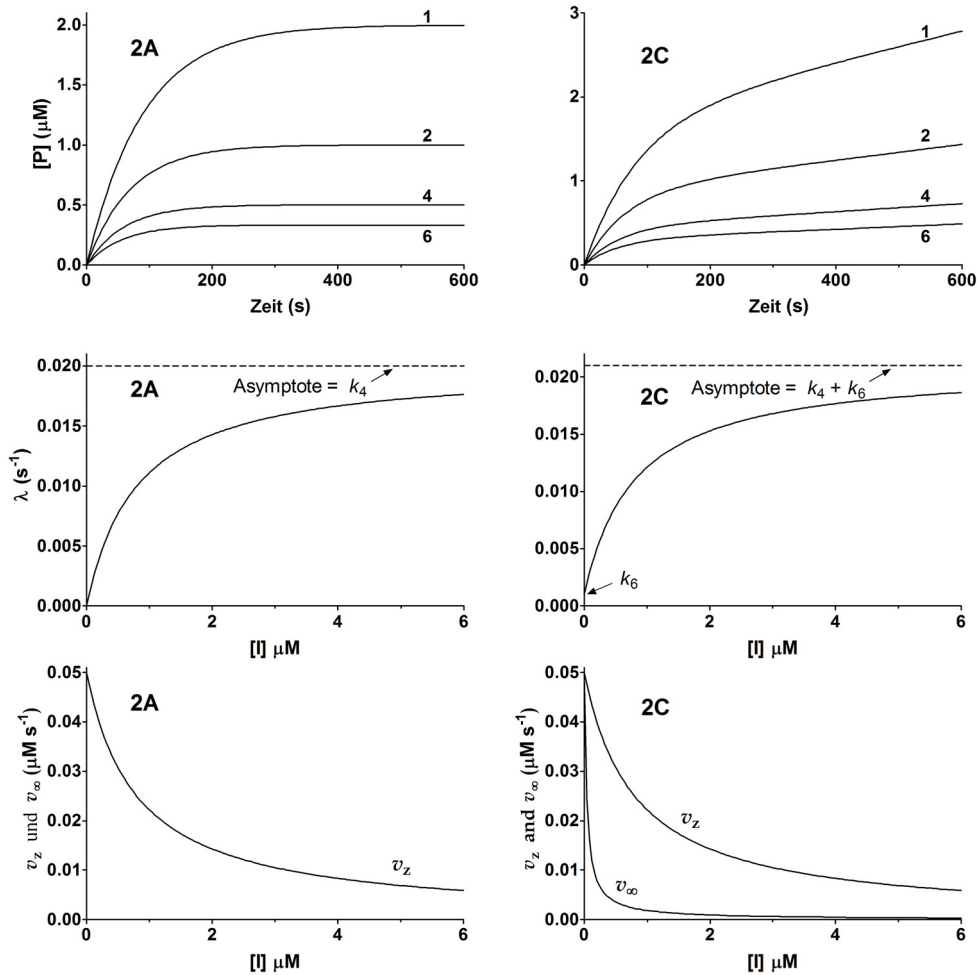


Abbildung 43: Verlaufskurven und diagnostische Parameter der Mechanismen **2A** und **2C** (Schema 29, S. 111). Die Nummern direkt neben den Kurven in den obersten Tafeln stellen die Konzentrationen des Inhibitors (μM) dar, mit welchen simuliert wurde. Die Kurven wurden mit den folgenden Parametern generiert, welche für beide Mechanismen gängig sind: $k_2 = 20 s^{-1}$, $[E]_t = 5 nM$, $[S] = K_m = 100 \mu M$, $k_3 = 0.5 \mu M^{-1} s^{-1}$, $k_{-3} = 0.2 s^{-1}$, $k_4 = 0.02 s^{-1}$. Zusätzlicher Parameter für den Mechanismus **2C**: $k_6 = 0.001 s^{-1}$.

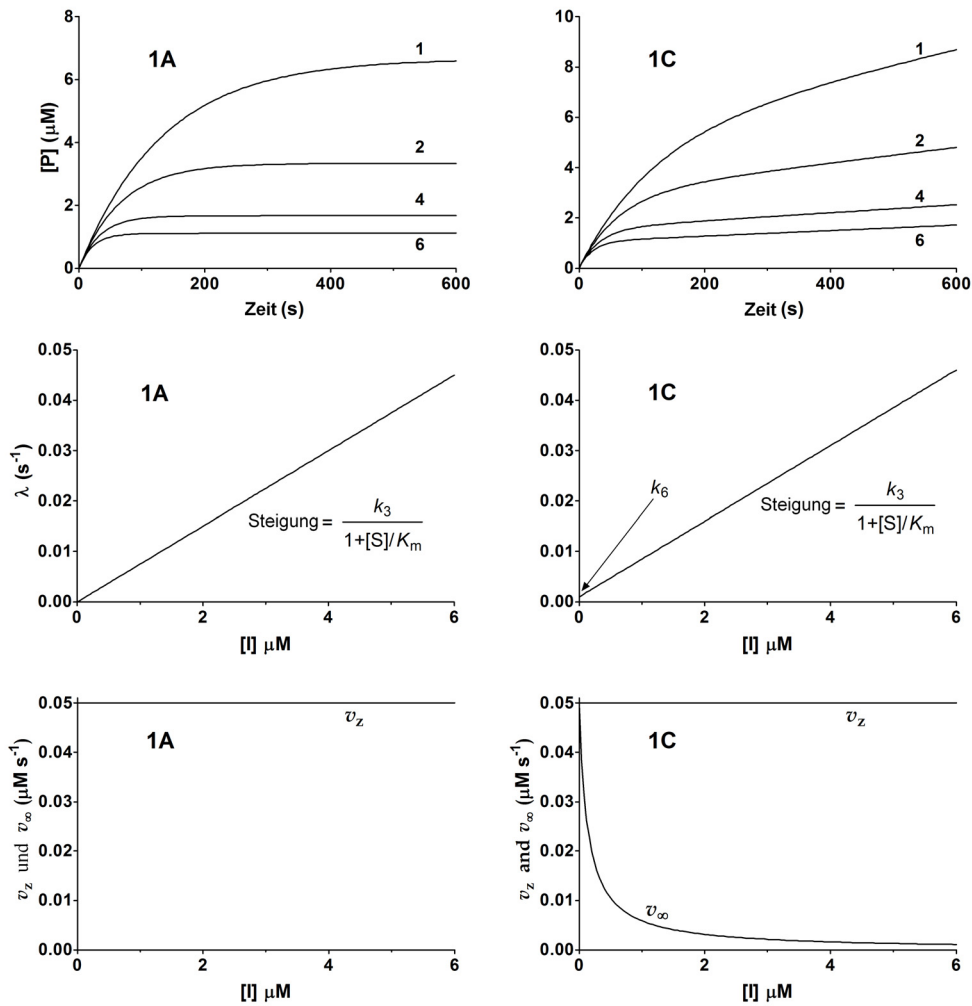


Abbildung 44: Verlaufskurven und diagnostische Parameter der Mechanismen **1A** und **1C** (Schema 30, S.112). Die Nummern direkt neben den Kurven in den obersten Tafeln stellen die Konzentrationen des Inhibitors (μM) dar, mit welchen simuliert wurde. Die Kurven wurden mit den folgenden Parametern generiert, welche für beide Mechanismen gängig sind: $k_2 = 20 \text{ s}^{-1}$, $[E]_t = 5 \text{ nM}$, $[S] = K_m = 100 \mu\text{M}$, $k_3 = 0.015 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Zusätzlicher Parameter für den Mechanismus **1C**: $k_6 = 0.001 \text{ s}^{-1}$.

Die Verlaufskurven und Parameterabhängigkeiten für die Mechanismen **1A** und **1C** sind in **Abbildung 44** gezeigt. Die diagnostischen Merkmale des Systems **1A** sind Verlaufskurven der Steigung Null bei v_∞ und eine lineare Abhängigkeit von $[I]$ mit einem Schnittpunkt Null auf der Ordinate. Die Bestimmung des Schnittpunkts mit der Ordinate (> 0) für den Mechanismus **1C**, welcher auch gerade k_6 entspricht, ist

abhängig von der Qualität der experimentellen Daten. Bei nicht eindeutigen Messungen kann der Schnittpunkt nicht bestimmt werden. In diesem Fall wäre dann ein statistischer Test zur Evaluation einer signifikanten Abweichung des Schnittpunkts von Null sinnvoll. Auch für den Mechanismus **1C** ist es nicht möglich, eine Unterscheidung aufgrund der Analyse der Graphiken vom Mechanismus **1A-R** zu machen. Auch hier sind Präinkubationsexperimente, wie sie schon oben beschrieben worden sind, die Lösung des Problems.

5.8.3.4 Inhibition durch eine instabile Verbindung, Mechanismus 1B

Ein analytischer Ausdruck für λ existiert für dieses Modell nicht, da die Inhibitorkonzentration mit der Zeit variiert. Ein analytischer Ausdruck für die integrierte Geschwindigkeitsgleichung kann mittels einer MCLAURIN Reihenexpansion erhalten werden [127].

$$[P] = \frac{v_z}{k_5} e^{-\left\{ \frac{k_3 K_m [I]_t}{k_5 (K_m + [S])} \right\}} \left\{ k_5 t + \sum_{i=1}^{\infty} \left\{ \frac{k_3 K_m [I]_t}{k_5 (K_m + [S])} \right\}^i \frac{[1 - (e^{-k_5 t})^i]}{i \cdot i!} \right\} \quad (25)$$

In **Gleichung 25** ist $v_z = v_0$, K_m kann mit dem Substrat (ohne Inhibitor) alleine bestimmt werden und $[I]_t$ ist die total eingesetzte Inhibitorkonzentration. Die Parameter k_3 und k_5 können, durch Anpassung der Gleichung an die Verlaufskurve, mittels nicht-linearer Regression erhalten werden.

Die Menge an Termen, angegeben durch den Index i in **Gleichung 25**, welche bei der Regression benutzt werden sollte, hängt vom Wert für k_5 ab: ein kleiner Wert benötigt mehr Terme als ein grosser. Zum Beispiel reichen drei Terme bei einem $k_5 = 0.005 \text{ s}^{-1}$, hingegen braucht es zehn Terme bei einem $k_5 = 0.001 \text{ s}^{-1}$. Natürlich kann man routinemässig mit zehn Termen *fitten*.

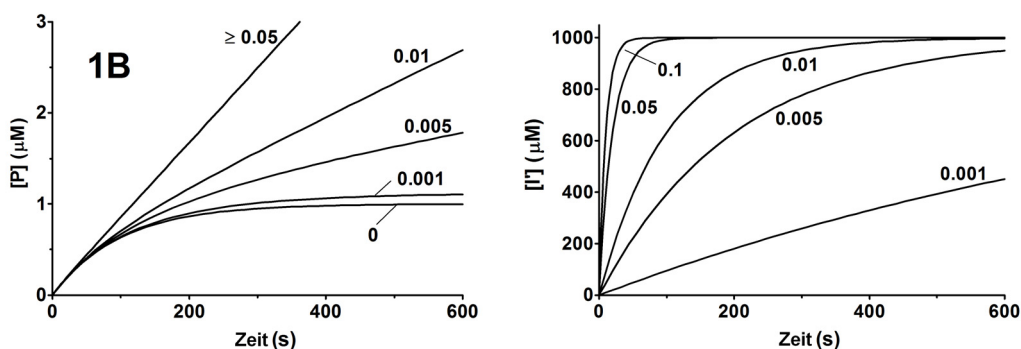


Abbildung 45: Verlaufskurve für einen instabilen Inhibitor, Mechanismus **1B** (Schema 30). Links: Verlaufskurven; rechts: Konzentration des chemisch inerten Inhibitors I' . Die Kurven wurden durch numerische Integration mit Matlab-Simulink Software simuliert. Dazu wurden folgende Parameter verwendet; $k_2 = 0.2 \text{ s}^{-1}$, $k_3 = 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_m = 1 \text{ mM}$, $[S] = 1 \text{ mM}$, $[E]_t = 100 \text{ mM}$, $[I]_t = 1 \text{ mM}$, k_5 variiert von 0 bis 0.1 s^{-1} wie gezeigt (Nummern direkt neben den Kurven). Für $k_5 = 0$ gibt es keine Produktion von I' , und die Verlaufskurve entspricht derjenigen des Mechanismus **2A** (Abbildung 43, Schema 29).

Die simulierten Verlaufskurven für den instabilen Inhibitor (**1B**) sind in **Abbildung 45** (linker Graph) gezeigt. Diese Kurven entsprechen nicht der Kurve mit $k_5 = 0$ (entspricht einem stabilen Inhibitor). Stattdessen nimmt die spontane Zerfallsgeschwindigkeit des Inhibitors zur inerten Spezies I' mit steigendem k_5 zu, wie in **Abbildung 45** (rechter Graph) gezeigt. Folglich sind die Kurven denjenigen von reversiblen Inhibitoren sehr ähnlich, und die Verlaufskurve wird für hohe Werte von k_5 linear, weil I sehr schnell zerfällt.

Die gerade Linie in **Abbildung 45** (z. B. die Kurve mit $k_5 = 0.01 \text{ s}^{-1}$), welche auf die Exponentialphase folgt, entspricht nicht einem *steady-state*, aber sie widerspiegelt die kontinuierliche Abnahme der Inhibitorkonzentration nach **Gleichung 25**. Versuche, die Daten eines instabilen Inhibitors mit den **Gleichungen 17** und **18** zu berechnen, führen zu inkonsistenten *Fittings* mit statistisch bedeutungslosen Resultaten. Das hat folgenden Grund: Damit eine Integration der Geschwindigkeitsgleichung durchgeführt werden kann, muss $[I]$ über die Zeit konstant bleiben. Diese Bedingung

ist beim Mechanismus **1B** verletzt. Diese Tatsache stellt ein nützliches Instrument dar, um Mechanismus **1B** von anderen Mechanismen zu unterscheiden.

Trotzdem können die Verlaufskurven von instabilen Inhibitoren nach Mechanismus **1B** den Verlaufskurven der Mechanismen von **1A-R** und **1C** sehr ähnlich sein. Eine Unterscheidung ist möglich, wenn man den Inhibitor alleine im *assay*-Puffer für zwei bis drei verschiedene Zeitperioden präinkubiert. Anschliessend gibt man zuerst das Substrat und darauf folgend das Enzym zum Starten der Reaktion hinzu: die Reaktionsprofile von **1A-R** und **1C** sind unabhängig von der Präinkubationszeit, aber die Reaktionsgeschwindigkeit im Fall von Mechanismus **1B** wird mit zunehmender Präinkubationszeit zunehmen, was das Verschwinden des Inhibitors durch Hydrolyse widerspiegelt. Wenn der ganze Inhibitor während der Präinkubation zerfällt, kehren die Geschwindigkeiten zu den Kontrollwerten zurück (z. B. Steigung der Kurve mit $k_5 \geq 0.05 \text{ s}^{-1}$, wie in **Abbildung 45** links gezeigt). Für sehr kleine Werte von k_5 kann die Instabilität in dynamischen *assays* über kurze Zeit nur schwer abgeschätzt werden (z. B. die Kurve mit $k_5 = 0.001 \text{ s}^{-1}$).

Zusammenfassend kann man sagen, dass dieses Konzept die Wichtigkeit von Verlaufskurven als Mittel zur Unterscheidung zwischen Mechanismen und für die Berechnung von Inhibitionskonstanten zweiter Ordnung hervorhebt. Die Verlaufskurvenmethode hat viele praktische und statistische Vorteile gegenüber anderen Methoden ([45][115][116][130 – 133]). Nach der Wahl eines geeigneten Substrates, welches die kontinuierliche Detektion des Reaktionsfortgangs erlaubt, und der Bestimmung der kinetischen Parameter V und K_m für dieses Substrat, konnte die Datenkollektion anhand der Aufzeichnung der Produktbildung bei bestimmten $[S]$ und $[E]$ bei verschiedenen $[I]$ kontinuierlich erfolgen. Der kompetitive Charakter des Inhibitors kann durch Datenkollektion bei verschiedenen $[S]$ bestimmt werden. Die **Gleichungen 17** oder **18** werden an jede experimentelle Kurve durch nicht-lineare Regression angepasst⁴⁹, um die Parameter λ , v_z und v_∞ zu berechnen, welche

⁴⁹ Zum Anpassen (*fitten*) der Daten wurde von mir das Programm Microcal™ Origin Pro™ Version 7.5G SR3 v.7.5853 (www.originlab.com) und von BAICI das Programm GraphPad Prism Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, (www.graphpad.com) verwendet. Die Resultate aus den beiden Programmen unterschieden sich jeweils nur unwesentlich voneinander.

ihrerseits wieder gegen [I] aufgetragen werden, um den Mechanismus zu bestimmen und die relevanten kinetischen Daten zu berechnen. Eine Hyperbel oder eine Gerade, welche durch den Nullpunkt der Achsen verläuft, ist diagnostisch für die Mechanismen **2A** resp. **1A**. Es ist jedoch Vorsicht geboten: irreversible Enzyminhibitionen können mit dieser Methode nur schwer von den reversiblen langsam, fest-bindenden Inhibitionen (*slow, tight-binding inhibition*) unterschieden werden. Dazu sind die oben beschriebenen Präinkubationsexperimente erforderlich.

5.8.3.5 Symbole und nomenklatorische Konventionen der Enzymkinetik

d = Verschiebung (*displacement*) einer Verlaufskurve vom Nullpunkt.

E = Freies Enzym

EI = Adsorptiver Enzym-Inhibitor oder Enzym-Inaktivator Komplex

E•I = Reversibler Enzym-Inhibitor Komplex (kompetitiv mit Substrat)

E–I = Irreversibel, kovalent modifiziertes Enzym (kompetitiv mit Substrat)

ES = Enzym-Substrat Komplex

I = Inhibitor (reversibler Inhibitor oder irreversibler Modifikator (Inaktivator))

I' = Chemisch veränderter I (z.B. durch Hydrolyse), welcher das Enzym nicht länger binden kann.

I* = Enzymatisch veränderter I, welcher das Enzym nicht länger binden kann.

k_1, k_3 = Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung

$k_{-1}, k_2, k_{-3}, k_4, k_5, k_6, k_7, k_{-7}$ = Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung

$K_i = k_{-3}/k_3$ = Dissoziationskonstante

$k_i = k_4/K_i$ = Inhibitionskonstante zweiter Ordnung

P = Produkt(e)

S = Substrat

v_s = Reaktionsgeschwindigkeit im *steady-state*

v_z = Reaktionsgeschwindigkeit bei $t = 0$

v_0 = Reaktionsgeschwindigkeit ohne Modifikatoren

λ = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung in der exponentiellen Phase der Bildung von E–I oder EI

[X] = Konzentration der freien Spezies X in $\text{Mol} \times \text{dm}^{-3}$

$[\text{X}]_t$ = Totale Konzentration der Spezies X

$[\text{X}]_z$ = Konzentration der Spezies X bei $t = 0$

5.8.3.6 Repräsentative Beispiele

Die Anwendung des beschriebenen Konzepts erbrachte reproduzierbare und konsistente kinetische Daten zu den 3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphadecalinen⁵⁰ der Typen **I-V** (*Abbildung 4*, S. 18). Im folgenden Abschnitt werden ausgewählte repräsentative Resultate gezeigt, welche die praktische Anwendung des Protokolls illustrieren (siehe Strukturen *Abbildung 46*).

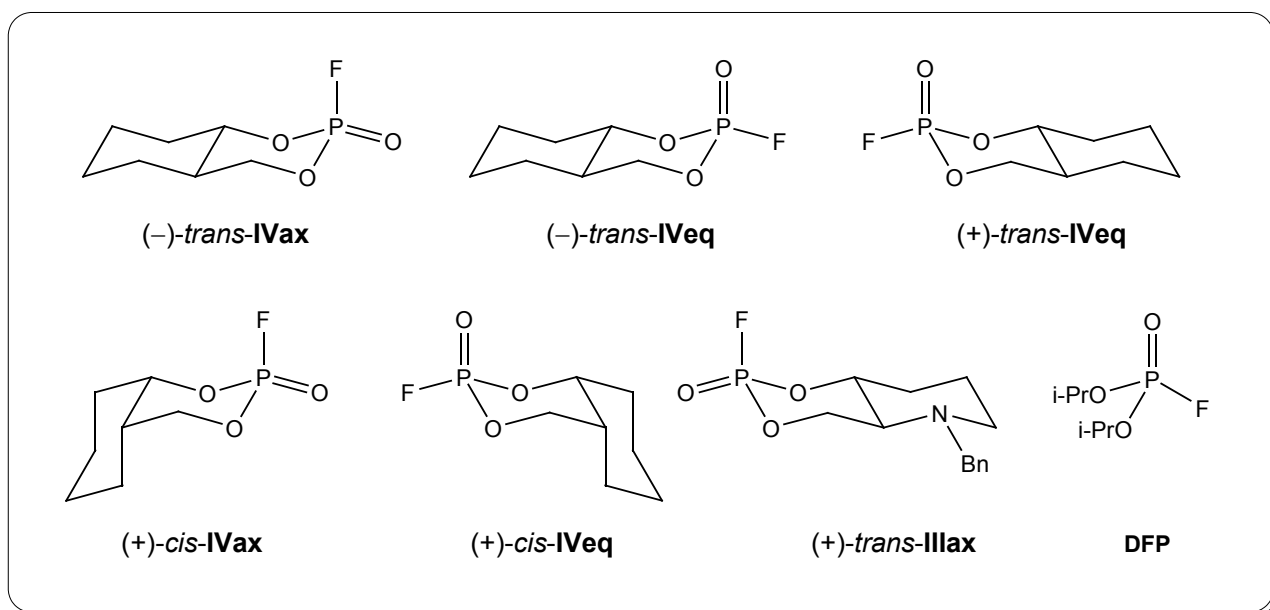


Abbildung 46: Die repräsentativen 2,4-dioxa-3-fluoro-phosphadecaline (**DFP** als Referenz).

Die Inhibitionsexperimente an AChE mit den Organophosphaten wurden mittels ELLMAN assay [117] bei pH 7.00 ± 0.02 in Anwesenheit von Substrat (Acetylthiocholin) und dem chromogenen 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoesäure-3,3'-6) durchgeführt. Die Verlaufskurven wurden über einen Wellenlängenbereich von 410 - 414 nm (Dianion von 5-thio-2-nitrobenzoesäure, $\lambda_{\text{max}} = 412$ nm) aufgezeichnet.

Der Vergleich von **DFP** mit dem irreversiblen Inhibitor **(-)-trans-IVax** ist in der *Abbildung 47* gezeigt. Es gab bei diesen Inhibitoren keinerlei diagnostische

⁵⁰ Da die präsentierten diagnostischen Methoden allgemeine Gültigkeit haben, wurden den repräsentativen Inhibitoren in *Abbildung 46* die Namen ihrer grundlegenden Strukturtypen gegeben.

Probleme. Die lineare Abhängigkeit λ von $[I]$, der Schnittpunkt mit der Ordinate, der statistisch betrachtet nicht verschieden von Null ist und die Unabhängigkeit von v_z von $[I]$, lassen für beide Inhibitoren auf einen Mechanismus **1A** schliessen. (–)-*trans*-**IVax** ist mit einer 5.3-fach grösseren Inhibitionskonstante zweiter Ordnung (k_3) ein signifikant besserer Inhibitor als **DFP**.

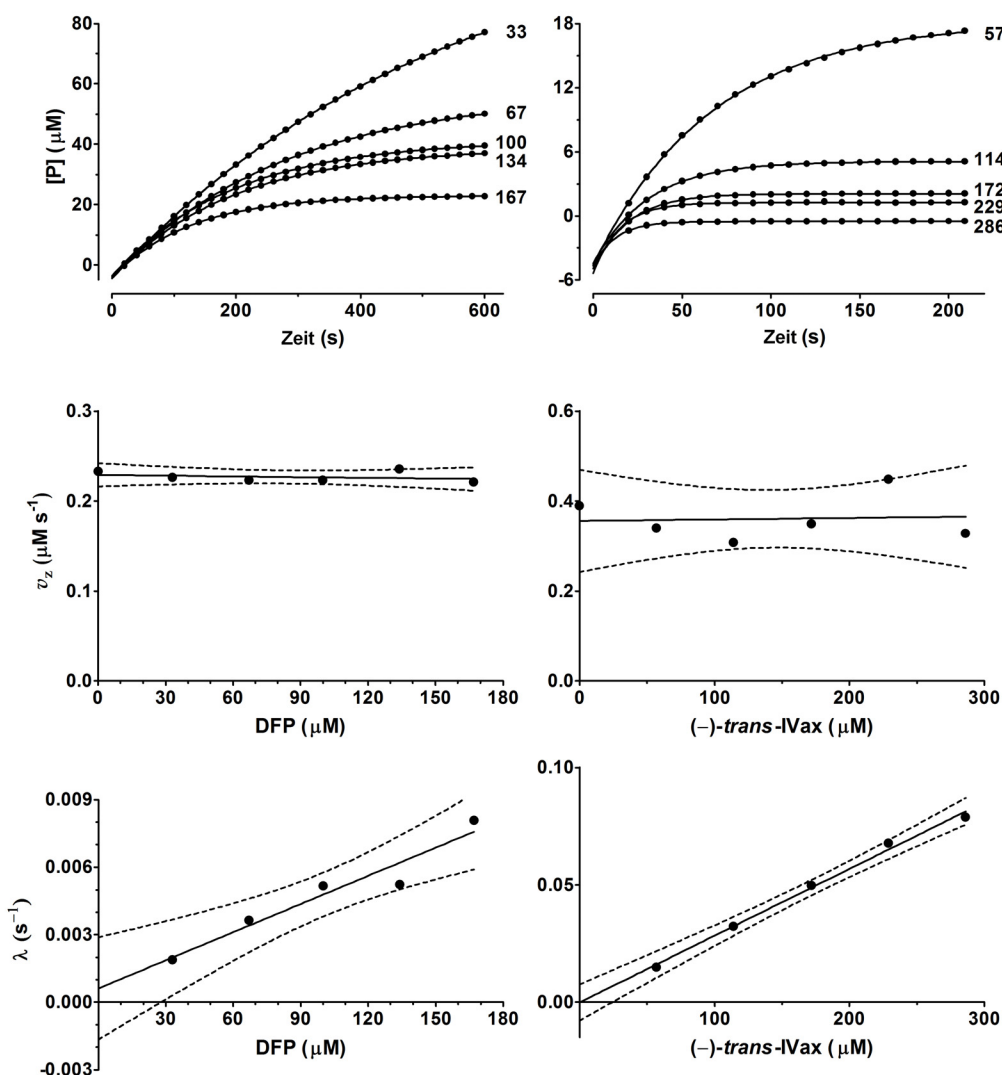


Abbildung 47: Inhibition von AChE mit **DFP** (linke Spalte) und (–)-*trans*-**IVax** (rechte Spalte). In den beiden obersten Graphen ist jeweils der Übersicht halber nur jeder 20. Datenpunkt aufgetragen und die durchgezogenen Linien stellen die bestmöglichen fittings mit der **Gleichung 17** dar. Die gepunkteten Linien um die experimentellen Punkte in den vier unteren Graphen stellen das 95 % Konfidenzband dar. Beide Inhibitoren werden durch den Mechanismus **1A** mit den Gleichungen aus **Tabelle 16**, den Reaktionswegen aus **Schema 30** und den simulierten Kurve in **Abbildung 44** beschrieben.

In **Abbildung 48** sind zwei Inhibitoren gezeigt, welche als irreversible Inhibitoren in zwei Schritten agieren. Die Verlaufskurven mit Asymptoten, welche parallel zur Zeitachse laufen, die hyperbolische Abhängigkeit von v_z und λ von $[I]$ und die Kurve, welche durch den Ursprung der Achsen geht, lassen keinen Zweifel daran, dass (+)-*cis*-**IVax** nach Mechanismus **2A** inhibiert. Bei (+)-*trans*-**IVeq** hingegen sieht die Verlaufskurve nach der Art eines reversiblen, langsam-bindenden Mechanismus aus. Die chemische Natur des Inhibitors und unabhängige Untersuchungen mittels ^{31}P -NMR Experimenten, deuten aber auf eine temporäre irreversible Inhibition hin, welche in einem Prozess über zwei Schritte einen Komplex E–I bildet, der anschliessend wieder in freies Enzym und einen inerten Inhibitor I^* mit einer Geschwindigkeitskonstante $k_6 = 0.014 \text{ s}^{-1}$ zerfällt. Dies entspricht einer Halbwertszeit von 49.5 s. Das heisst: der kovalente E–I Komplex ist in *ca.* 6 Minuten (7 mal die Halbwertszeit) fast komplett zerfallen ist.

In **Abbildung 49** (S. 129) werden zwei kritische Fälle illustriert, welche auftreten, wenn irreversible Inhibitoren sehr langsam an das Enzym binden (die Inhibitionskonstanten zweiter Ordnung sind um $40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und zudem auch noch temporäre Inhibition zeigen. Da die Bildung von E–I ein sehr langsamer Prozess ist, kann die Verlaufskurve auch nur über einen beschränkten Zeitraum beobachtet werden, nämlich nur so lange, bis nicht mehr als 10 – 15% des Substrates aufgebraucht sind. Wie man schön sieht, sind die erhaltenen Verlaufskurven nicht sehr aussagekräftig, da sie nicht vollständig sind. Man sieht noch nicht, wie die Kurve weiter verläuft. Natürlich kann man Reaktionen für längere Zeiten verfolgen, doch in unserem Fall gibt es zwei Probleme. Erstens: der übermässige Substratverbrauch verletzt die notwendige Bedingung, dass die Substratkonzentration während der Messzeit näherungsweise nicht ändern soll. Die Krümmung der Verlaufskurve wurde als irreversible, temporäre Inhibition interpretiert. Und zweitens: die Absorptionsmesswerte steigen viel zu schnell an, sodass Abweichungen vom LAMBERT-BEER'schen Gesetz auftreten. Deshalb ist eine verlässliche Interpretation der Daten erschwert oder gar unmöglich. Die Inhibitoren sind auch nicht von grossem

praktischen Interesse, doch ihre Kinetik kann zumindest qualitativ beurteilt werden. Daher deuten die diagnostischen *plots* von (+)-*trans*-IIIax (*Abbildung 49*, rechte Spalte) auf einen Mechanismus 1C hin, obwohl v_z nicht gänzlich unabhängig von [I] ist.

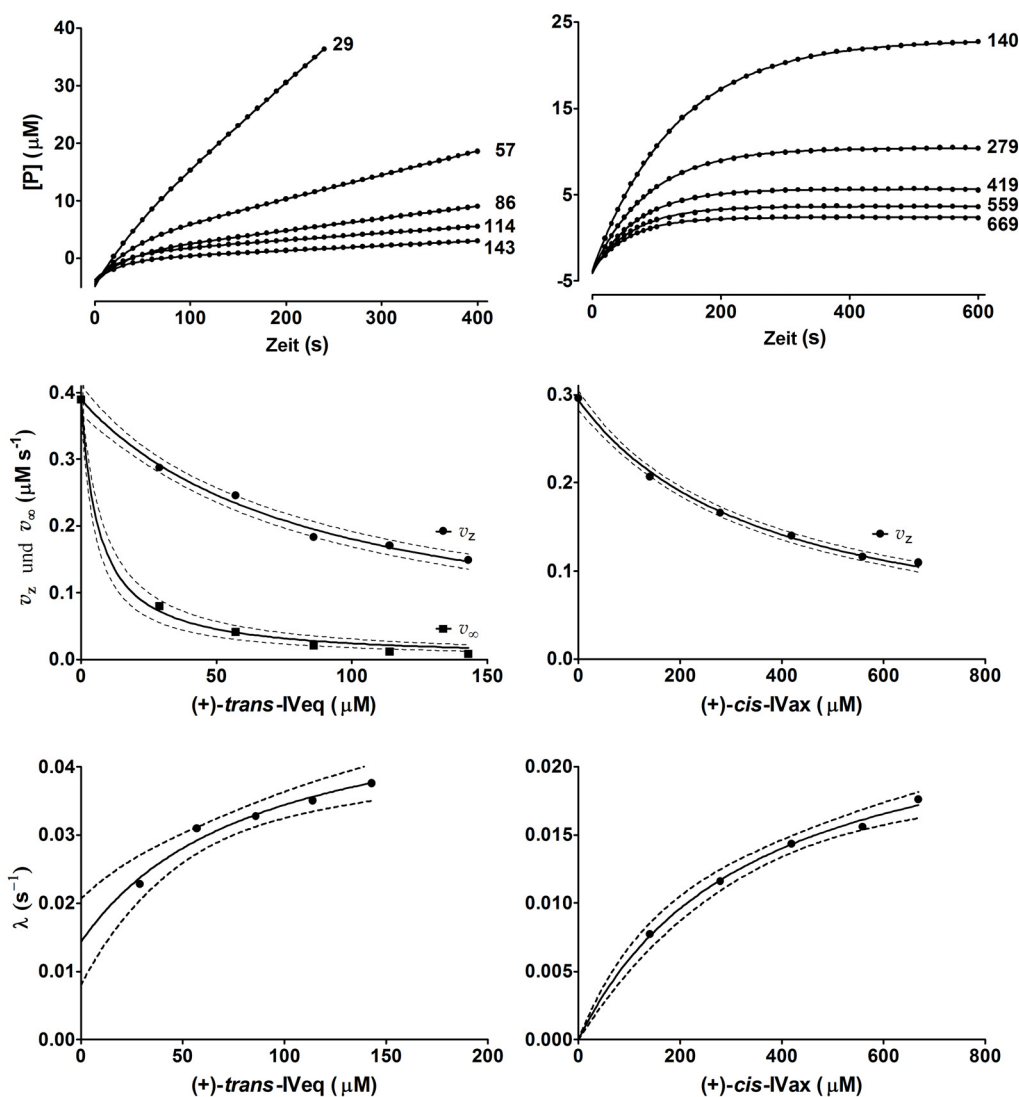


Abbildung 48: Inhibition von AChE mit (+)-*trans*-IVeq (linke Spalte) und (+)-*cis*-IVax (rechte Spalte). In den beiden obersten Graphen ist jeweils der Übersicht halber nur jeder 20. Datenpunkt aufgetragen und die durchgezogenen Linien stellen die bestmöglichen fittings mit der **Gleichung 18** (links) und **Gleichung 17** (rechts) dar. Die gepunkteten Linien um die experimentellen Punkte in den vier unteren Graphen stellen das 95 % Konfidenzband dar. (+)-*trans*-IVeq wird durch den Mechanismus 2C und (+)-*cis*-IVax durch den Mechanismus 2A beschrieben (Gleichungen aus **Tabelle 15**, Reaktionswege aus **Schema 29** und die simulierten Kurven aus **Abbildung 43**).

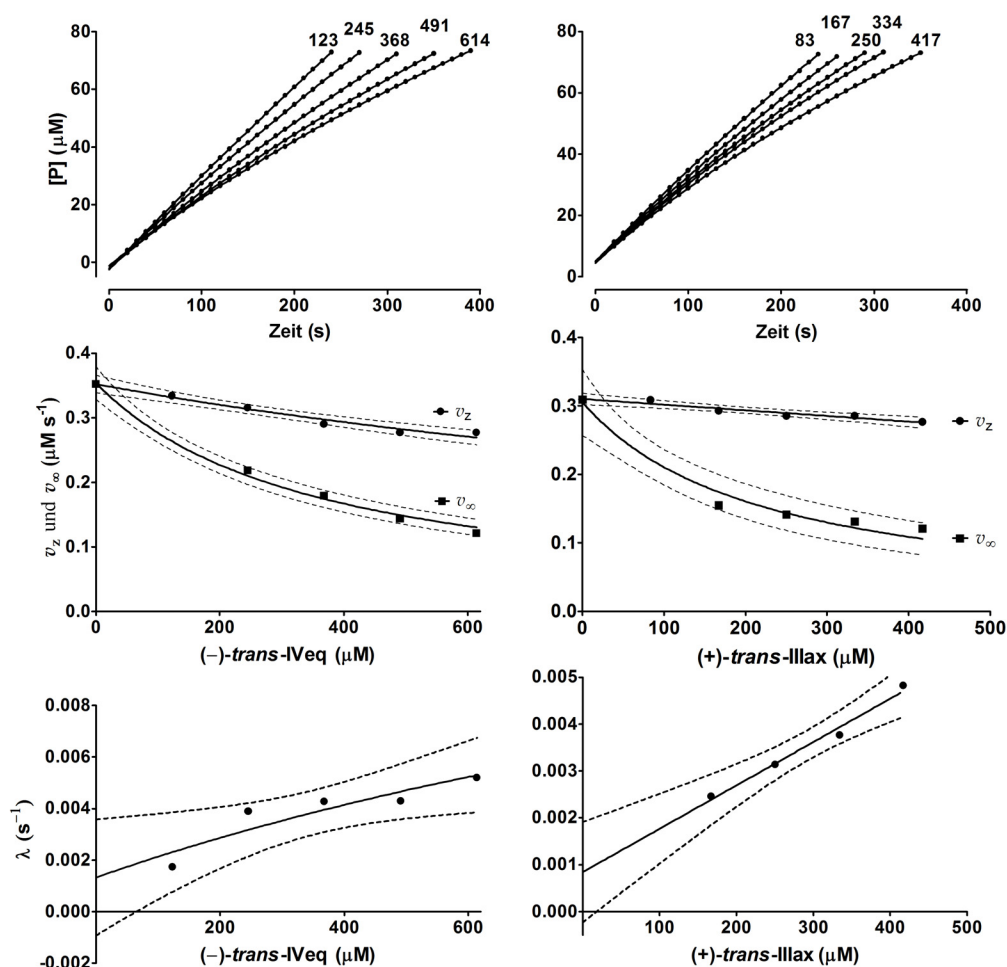


Abbildung 49: Inhibition von AChE mit (–)-trans-IVeq (linke Spalte) und (+)-trans-IIIax (rechte Spalte). In den beiden obersten Graphen ist jeweils der Übersicht halber nur jeder 20. Datenpunkt aufgetragen und die durchgezogenen Linien stellen die bestmöglichen fittings mit der **Gleichung 18** dar. Die gepunkteten Linien um die experimentellen Punkte in den vier unteren Graphen stellen das 95 % Konfidenzband dar. (–)-trans-IVeq wird durch den Mechanismus **2C** (Gleichungen aus **Tabelle 15**, Reaktionswege aus **Schema 29** und die simulierten Kurven aus **Abbildung 43**) und (+)-trans-IIIax durch den Mechanismus **1C** (Gleichungen aus **Tabelle 16**, Reaktionswege aus **Schema 30** und die simulierten Kurven aus **Abbildung 44**) beschrieben.

Für (–)-trans-IVeq (**Abbildung 49**, linke Spalte) passt aus einfachen statistischen Gründen der nicht-lineare Regression der Verlaufskurve der Mechanismus **2C** am besten. Man muss hier aber vernünftigerweise zugeben, dass zwischen den *plots* in

der linken und der rechten Spalte kein grosser Unterschied zu erkennen ist und die Kurven von (–)-*trans*-**IVeq** deshalb auch einen Mechanismus **1C** beschreiben könnten.

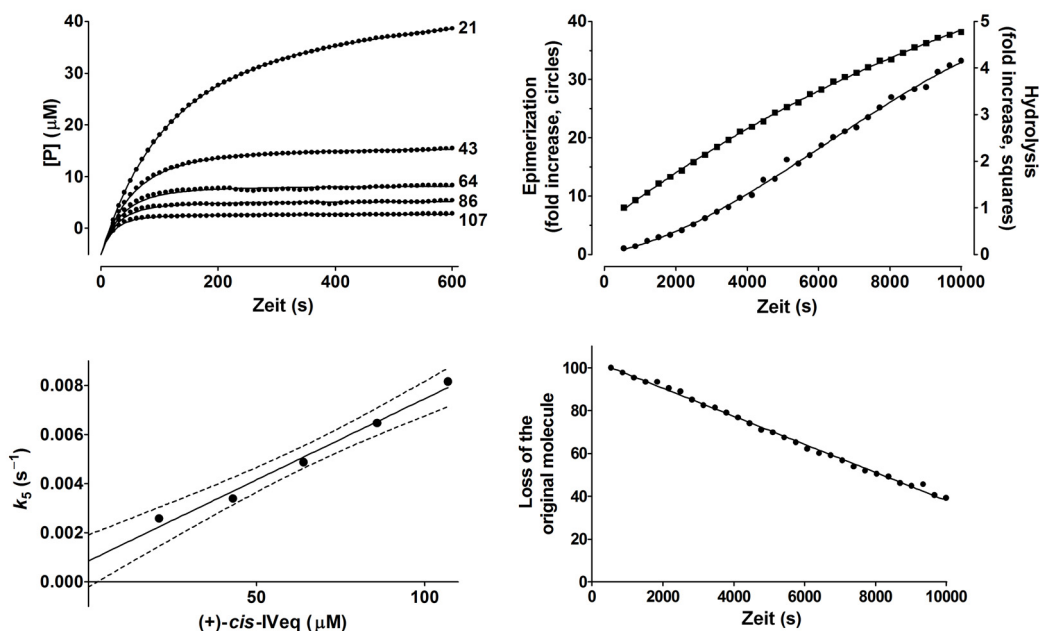


Abbildung 50: Inhibition von AChE mit (+)-*cis*-**IVeq**. In der oberen linken Graphik wurde der Übersichtlichkeit halber nur jeder 20. Datenpunkt dargestellt. Die durchgezogenen Linien stellen die besten fits mit **Gleichung 25** dar. Die Zerfallskonstante k_5 ist nicht konstant, sondern ist abhängig von der Inhibitorkonzentration. Die untere rechte Graphik zeigt die Instabilität des Moleküls, welche anhand des Verschwindens des ³¹P-NMR Signals ($\delta = -13.34$ ppm) mit der Zeit bestimmt wurde. In der oberen rechten Graphik sind das Erscheinen des Epimers ($\delta = -12.95$ ppm) und die Bildung des Hydrolyseproduktes ($\delta = -1.98$ ppm) gezeigt, welche ebenfalls mittels ³¹P-NMR Messungen bestimmt wurden. Der Mechanismus für diesen Inhibitor ist **1D**.

Wenn man einen Mechanismus **1C** annimmt, so erhält man $k_3 = 30 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und mit dem Mechanismus **2C** $k_i = 37 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Der Unterschied zwischen diesen beiden Inhibitionskonstanten zweiter Ordnung ist marginal, wenn man die Komplexität der Vorgänge berücksichtigt. Dieses letzte Beispiel zeigt die Grenzen der Methode für die Entscheidungsfindung auf. Glücklicherweise gilt dieses Charakteristikum nur für Moleküle, welche von kleinem praktischen Interesse sind.

Zum Schluss ist in **Abbildung 50** der knifflige Fall der Verbindung (+)-*cis*-**IVeq** gezeigt. Die Verlaufskurven (Graphik links oben) deuten auf den ersten Blick auf einen irreversiblen Inhibitor nach dem Mechanismus **1A** hin. Bei eingehender Analyse der Kurve kann man aber eine leicht positive Steigung der Gerade nach der Exponentialphase feststellen, was eher auf einen reversiblen (**1A-R**) oder einen irreversiblen, temporären Mechanismus (**1C**) schliessen lässt. Eine weitere Charakteristik stellt die Inkonsistenz der Abhängigkeit von λ von der Inhibitorkonzentration dar, wenn die erste Analyse mit den **Gleichungen 10, 17** oder **18** durchgeführt wird.

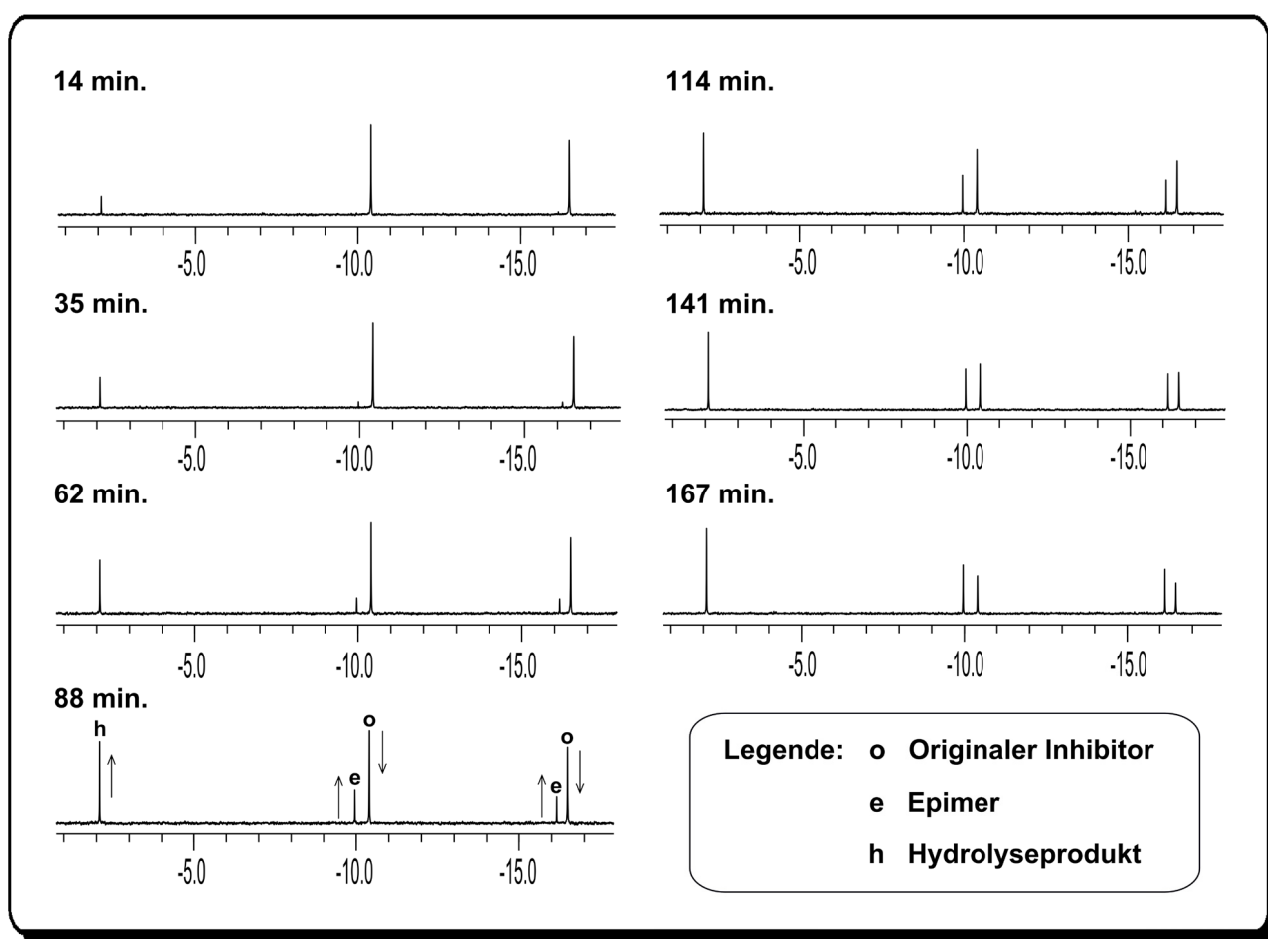


Abbildung 51: Instabilität von (+)-*cis*-**IVeq** im $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum (161.9 MHz, 300 K, Phosphatpuffer in D_2O , $\text{pH}^{*58} = 4.00$). Es wurden Spektren zu insgesamt 30 verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen. Und bei jeder Messung wurde die gleiche Anzahl scans durchgeführt, um die Spektren miteinander vergleichen zu können.

An diesem Punkt wird die Chemie der Verbindungen besonders wichtig, da alleine auf der Grundlage der kinetischen Analyse keine verlässliche Aussage über den Mechanismus mehr gemacht werden kann.

Verbindung	Kinetische Parameter	Mechanismus
(-)- <i>trans</i> - IVax	$k_3 = 968 \pm 43 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	1A
(+)- <i>trans</i> - IVeq	$K_i = 20.8 \pm 1.3 \text{ }\mu\text{M}$ $k_4 = 0.037 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$ $k_i = 1280 \pm 150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.014 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$	2C
(-)- <i>trans</i> - IVeq	$K_i = 463 \pm 47 \text{ }\mu\text{M}$ $k_4 = 0.017 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$ $k_i = 37 \pm 9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.0013 \pm 0.0007 \text{ s}^{-1}$	2C
(+)- <i>cis</i> - IVax	$K_i = 85 \pm 3 \text{ }\mu\text{M}$ $k_4 = 0.026 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ $k_i = 306 \pm 16 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	2A
(+)- <i>cis</i> - IVeq	$k_3 = 2260 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_5 = 0.026 \text{ s}^{-1}$ $k_6 = 0.00004 \text{ s}^{-1}$	1D
(+)- <i>trans</i> - IIIax	$k_3 = 39 \pm 3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.00084 \pm 0.00024 \text{ s}^{-1}$	1C
DFP	$k_3 = 181 \pm 28 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	1A

Tabelle 17: Kinetische Daten der ausgewählten 3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphadecaline und die entsprechenden Mechanismen. **DFP** (*i*-PrO)₂POF) gilt als Referenz. Die Werte stellen die best-fit Parameter \pm Standardfehler der linearen Regression dar. Bei (+)-*cis*-**IVeq** wurden die Werte, als einzige Ausnahme, durch Optimierung mittels numerischer Integration eines Satzes von Differentialgleichungen, welche dem Mechanismus **1D** entsprechen, erhalten. Die Optimierungen wurden von BAICI mit Matlab-Simulink software (www.mathwork.com) durchgeführt.

In den rechten Graphiken der **Abbildung 50** (S. 130) wird die Instabilität von (+)-*cis*-**IVeq** gezeigt, welche mittels ^{31}P -NMR Spektroskopie analysiert wurde. Das Signal, welches dem originalen Inhibitor zugeordnet werden kann ($\delta = -13.34$ ppm), verschwindet mit zunehmender Dauer der Messungen, weil das Molekül gleichzeitig epimerisiert ((-)-*cis*-**IVax**, $\delta = -12.95$ ppm) und hydrolysiert (Hydrolyseprodukt, $\delta = -1.98$ ppm) (vgl. **Abbildung 51**, S. 131). Die besten *fits* zu den experimentellen Daten dieses instabilen Inhibitors wurden durch Anpassung der **Gleichung 25**, durch Gebrauch der MACLAURIN Reihenentwicklung bis zum 10. Term, an die Verlaufskurven erhalten. Dies geschah alles unter der Annahme eines Mechanismus **1B**. Die Gleichung ist allerdings nur gültig, wenn der Inhibitor in eine inerte Spezies zerfällt. Das P(3)-Epimer von (+)-*cis*-**IVeq** ist aber auch ein Inhibitor, jedoch ein viel schwächerer. Ausserdem gibt es Hinweise, dass E–I langsam zu freiem Enzym und inerner Inhibitorspezies I^* zerfällt. Dieser Vorgang erklärt, weshalb die Instabilitätskonstante k_5 , welche durch nicht-lineare Regression erhalten wurde, nicht wirklich konstant ist, sondern mit der Inhibitorkonzentration variiert (siehe Graphik links unten in **Abbildung 50**), wenn die Analyse mit **Gleichung 25** (Mechanismus **1B**) durchgeführt wird. Der wirkliche Mechanismus ist daher nicht **1B** sondern **1D**. Da der Beitrag des Epimers (langsamer Inhibitor) zur totalen Inhibition während der Messung als minimal betrachtet werden kann, ist es möglich durch eine Kombination von nicht-linearer Regression und numerischer Integrationsanalyse eine befriedigende Lösung zu finden. Die dazugehörigen kinetischen Daten sind in **Tabelle 17** (S. 132) zu finden.

5.8.4 Weitere Kinetische Daten

In *Tabelle 18*, *19* und *20* sind alle kinetischen Daten, welche im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurden, nochmals zusammengefasst. Aus den Daten, vor allem aus denjenigen der carbocyclischen Verbindungen, geht die deutliche Stereoselektivität der Inhibitionsreaktion hervor. Die stärksten carbocyclischen Inhibitoren sind sogar um ein Vielfaches bessere Inhibitoren als **DFP**, welches als sehr potente Standardreferenz benutzt wird.

Bei den carbocyclischen Decalinen in *Tabelle 18* ist auffallend, dass die stärksten Inhibitoren jeweils *S*-Konfiguration am Phosphor (S_P) aufweisen. Dies zeigt – im Falle dieser Serie – die Wichtigkeit der absoluten Konfiguration der Inhibitoren für eine signifikante Inhibition. Die racemischen Verbindungen, wie in *Tabelle 18* anhand der Verbindung (\pm)-**7ax** gezeigt wird, haben Inhibitionskonstanten zweiter Ordnung, welche ungefähr im arithmetischen Mittel zwischen den beiden enantiomeren Verbindungen liegen, was man intuitiv auch erwarten würde.

Die enzymkinetischen Daten der *N*-Benzyl-Acetylcholinmimetika sind in *Tabelle 19* zusammengefasst. Die Auswertung der Verlaufskurven war bei allen Verbindungen dieses Typs nicht sehr einfach, da die Verbindungen sehr schwache Inhibitoren sind und man die Verlaufskurven aufgrund des sehr schnellen Substratverbrauchs nur für sehr kurze Zeiten verfolgen konnte. Die Exponentialphasen können nicht bis zum Schluss verfolgt werden, was eine Aussage über die Situation am Ende der Reaktion verunmöglicht. Die Werte in *Tabelle 19* geben nur eine Tendenz an und können vom "wahren" Wert abweichen. Die Zuordnung der Mechanismen wurde anhand von rein statistischen Kriterien gemacht. Die Unterschiede in den Statistiken sind aber so klein, dass eine eindeutige Zuordnung der Mechanismen nur anhand der enzymkinetischen Daten sehr schwierig ist. Aufgrund von NMR-Untersuchungen kann man sagen, dass die Verbindungen (+)-**5ax**, (–)-**5ax**, (+)-**5eq**, (–)-**5eq**, (–)-**6ax** und (+)-**6ax** irreversible und die Verbindungen (–)-**6eq** und (+)-**6eq** reversible Inhibitoren sind.

Verbindung	Kinetische Parameter	Mechanismus
(-)- 7ax (S_P) (-)- <i>trans</i> - IVax	$k_3 = 968 \pm 43 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	1A
(+)- 7ax (R_P)	$k_3 = 60 \pm 2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	1A
(±)- 7ax	$k_3 = 451 \pm 4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	1A
(+)- 7eq (S_P) (+)- <i>trans</i> - IVeq	$K_i = 20.8 \pm 1.3 \text{ } \mu\text{M}$ $k_4 = 0.037 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$ $k_i = 1280 \pm 150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.014 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$	2C
(-)- 7eq (R_P) (-)- <i>trans</i> - IVeq	$K_i = 463 \pm 47 \text{ } \mu\text{M}$ $k_4 = 0.017 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$ $k_i = 37 \pm 9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.0013 \pm 0.0007 \text{ s}^{-1}$	2C
(+)- 8ax (S_P) (+)- <i>cis</i> - IVax	$K_i = 85 \pm 3 \text{ } \mu\text{M}$ $k_4 = 0.026 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ $k_i = 306 \pm 16 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	2A
(-)- 8ax (R_P)	$K_i = 95 \pm 14 \text{ } \mu\text{M}$ $k_4 = 0.005 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ $k_i = 54 \pm 13 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.0009 \pm 0.0006 \text{ s}^{-1}$	2C
(+)- 8eq (S_P) (+)- <i>cis</i> - IVeq	$k_3 = 2260 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_5 = 0.026 \text{ s}^{-1}$ $k_6 = 0.00004 \text{ s}^{-1}$	1D
(-)- 8eq (R_P)	$k_3 = 29.1 \pm 0.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.00016 \pm 0.00003 \text{ s}^{-1}$	1C

Tabelle 18: Kinetische Daten der carbocyclischen Inhibitoren. Die stärksten Inhibitoren sind die (S_P)-konfigurierten Verbindungen.

Verbindung	Kinetische Parameter	Mechanismus
(+)- 5ax ((+)- <i>trans</i> - IIIax)	$k_3 = 39 \pm 3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.00084 \pm 0.00024 \text{ s}^{-1}$	1C
(-)- 5ax	$k_3 = 12 \pm 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.00050 \pm 0.00008 \text{ s}^{-1}$	1C
(±)- 5ax	$k_3 = 13 \pm 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.00031 \pm 0.00003 \text{ s}^{-1}$	1C
(+)- 5eq	$k_3 = 70 \pm 4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	1A
(-)- 5eq	$K_i = 150 \pm 12 \text{ } \mu\text{M}$ $k_4 = 0.037 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$ $k_i = 246 \pm 24 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	2A
(-)- 6ax	$k_3 = 22 \pm 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	1A
(+)- 6ax	$k_3 = 12 \pm 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_6 = 0.00044 \pm 0.00005 \text{ s}^{-1}$	1C
(+)- 6eq	$K_i = 70 \pm 6 \text{ } \mu\text{M}$ $k_7 = 0.0022 \pm 0.0002 \text{ s}^{-1}$ $k_{-7} = 0.00034 \pm 0.00008 \text{ s}^{-1}$	2A-R
(-)- 6eq	$K_i = 283 \pm 54 \text{ } \mu\text{M}$	1A-R

Tabelle 19: Kinetische Daten der 7-N-Benzyl-ACh-Mimetika (Typ **III**).

Aus den Werten in **Tabelle 19** lässt sich aber die Tendenz herauslesen, dass die (*R*_P)-Acetylcholinmimetika tendenziell stärker binden als die (*S*_P)-konfigurierten. Bei den carbocyclischen Decalinen ist es genau umgekehrt.

Die Synthese der *N*-Allyl-Acetylcholinmimetika wurde durchgeführt, weil man den Einfluss der Sterik des Substituenten am Stickstoff auf die Inhibitionseigenschaften genauer untersuchen wollte. Die Ergebnisse in **Tabelle 20** bestätigen die

Interpretation von FUREGATI [2] mit den freien 7-Aza Acetylcholinmimetika. Die *N*-Allyl-Verbindungen inhibieren nicht signifikant anders als die *N*-Benzyl-derivate. Sie sind sogar leicht schwächere Inhibitoren. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Sterik des Substituenten keinen grossen Einfluss auf die Inhibitionseigenschaften hat. Vielmehr scheint die Benzylgruppe – durch Wechselwirkungen mit der "aromatischen" gorge – einen stabilisierenden Effekt während der Inhibitionsreaktion zu haben.

Verbindung	Kinetische Parameter	Mechanismus
(±)- 19ax	$K_i = 340 \pm 70 \mu\text{M}$ $k_4 = 0.022 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$ $k_i = 65 \pm 15 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	2A
(±)- 19eq	$K_i = 93 \pm 7 \mu\text{M}$ $k_4 = 0.015 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$ $k_i = 161 \pm 16 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $k_6 = 0.026 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$	2C
(±)- 20ax	$k_3 = 12.5 \pm 0.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	1A
(±)- 20eq	reversibel	? ⁵¹

Tabelle 20: Kinetische Daten der *N*-Allyl-ACh-Mimetika.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Sterik des Substituenten am Stickstoff nicht der entscheidende Faktor für den Verlauf der Inhibition ist. Wenn man die eklatanten Unterschiede in der Inhibitionsstärke zwischen den carbocyclischen Organophosphaten und den Acetylcholinmimetika anschaut, kommt man vielmehr zum Schluss, dass sich die höhere Flexibilität der carbocyclischen Decaline günstig

51 Die Exponentialphasen in den Verlaufskurven fehlen völlig. Da sich das *steady state* Gleichgewicht sehr schnell einstellt, befindet man sich zum Zeitpunkt der ersten Messung (nach dem Mischen, $t = 20 \text{ s}$) schon im *steady state* (lineare Steigung der Verlaufskurven). Die fehlenden Informationen der Exponentialphasen lassen eindeutige *Fits* nicht zu, weshalb eine genaue Bestimmung der Inhibitionskonstanten und des Mechanismus nicht möglich ist. *Stopped flow* Messungen könnten den Zugang zu den fehlenden Informationen ermöglichen. Da in dieser Arbeit vor allem nach irreversiblen Inhibitoren gesucht wurde, wurden diese aufwändigen Experimente nicht durchgeführt.

auf die Inhibition auswirkt. Wie BOURNE et al. [41] beschrieben haben, ist die physiologisch aktive Konformation des Acetylcholins in der PAS gestreckt und in der *active site gorge* gebogen. Das Acetylcholin muss bei der "Reise" durch die *gorge* also konformationelle Änderungen eingehen. Die carbocyclischen Decaline sind in hohem Masse fähig, konformationelle Änderungen einzugehen, wohingegen die Acetylcholinmimetika durch den *N*-Substituenten in ihrer Flexibilität eingeschränkt sind.

Die *N*-Benzyl-Acetylcholinmimetika sind zwar aufgrund ihrer geringeren Flexibilität eher langsame Inhibitoren, bilden aber – wohl aufgrund der stabilisierenden Wechselwirkungen der Benzylgruppe mit der "aromatischen" *gorge* – stabilere Enzym-Inhibitor-Komplexe als die carbocyclischen Organophosphate. Die Enzym-Inhibitor-Komplexe scheinen im Allgemeinen für die Hydrolyse besser zugänglich zu sein.

5.9 $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Untersuchungen an phosphorylierter AChE

5.9.1 Charakterisierung der Modellverbindungen

Damit die ^{31}P -chemischen Verschiebungen der verschiedenen AChE-Inhibitor-Addukte antizipiert werden können, wurden phosphorylierte Modellverbindungen hergestellt. In **Tabelle 21** sind die carbocyclischen Modellverbindungen mit den entsprechenden chemischen Verschiebungen in wässrigem NMR-LM (Guanidin- $\text{d}_5\cdot\text{DCl}$ (6 M), $\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (50 mM) und POPh_3 (208 μM) in D_2O) gezeigt. In **Tabelle 2** (S. 36) sind die 7-Aza-Modellverbindungen von FUREGATI [2] im gleichen Lösungsmittel beschrieben. Die Verbindungen mimetisieren den kovalent an das *active site* Serin (als ZSME = Z-Serinmethylester bezeichnet) gebundenen Inhibitor.

	$\delta (^{31}\text{P})$ $\text{pH} = 4.00 \pm 0.02$		$\delta (^{31}\text{P})$ $\text{pH} = 4.00 \pm 0.02$
	- 4.8		- 4.9
	- 4.0		- 3.7 / - 3.9 (1:1)
	- 1.6		- 2.1
Hydrolyseprodukt		Hydrolyseprodukt	

Tabelle 21: Carbocyclische Modellverbindungen und Hydrolyseprodukte in 6 M Guanidin- $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}/\text{Acetat}$; $\text{pH} = 4.00 \pm 0.02$; 300K. Als interne Referenz wurde POPh_3 ($\delta = + 37.1$) verwendet und auf eine 85% H_3PO_4 -Kapillare geeicht. Das anorganische Phosphat (Pi) wird bei $\delta = + 0.9$ detektiert.

In [134] ist beschrieben, dass die verschiedenen durch DFP phosphorylierten Serinhydrolasen (Chymotrypsin, Chymotrypsinogen, Atropinesterase und Subtilisin, kein AChE), wenn sie mit SDS, Harnstoff oder Guanidinium·HCl denaturiert werden, ^{31}P -chemische Verschiebungen aufweisen, welche nur selten mehr als 0.2 ppm von den chemischen Verschiebungen der entsprechenden Modellverbindungen abweichen. Diese Feststellung macht die "Analogie der chemischen Verschiebungen" zu einer sinnvollen Methode für die Analyse der Enzym-Inhibitor-Addukte im $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR.

Für die Synthese der carbocyclischen Modellverbindungen (deutert [73][74] und nicht-deutert) wurde jeweils zuerst POCl_3 mit ZSME umgesetzt und dann das entsprechende racemische Diol dazu gegeben (siehe Übersicht, S. 151 unten). Die axial und equatorial substituierten Verbindungen konnten chromatographisch leicht voneinander getrennt werden. Die axial substituierten Modellverbindungen eluierten vor den equatorial substituierten. Bis auf **22ax** sind alle axial ZSME-substituierten Modellverbindungen Feststoffe und die equatorial substituierten viskose Öle. Die Löslichkeit der Verbindungen im NMR-LM war bei allen Verbindungen ausreichend gut.

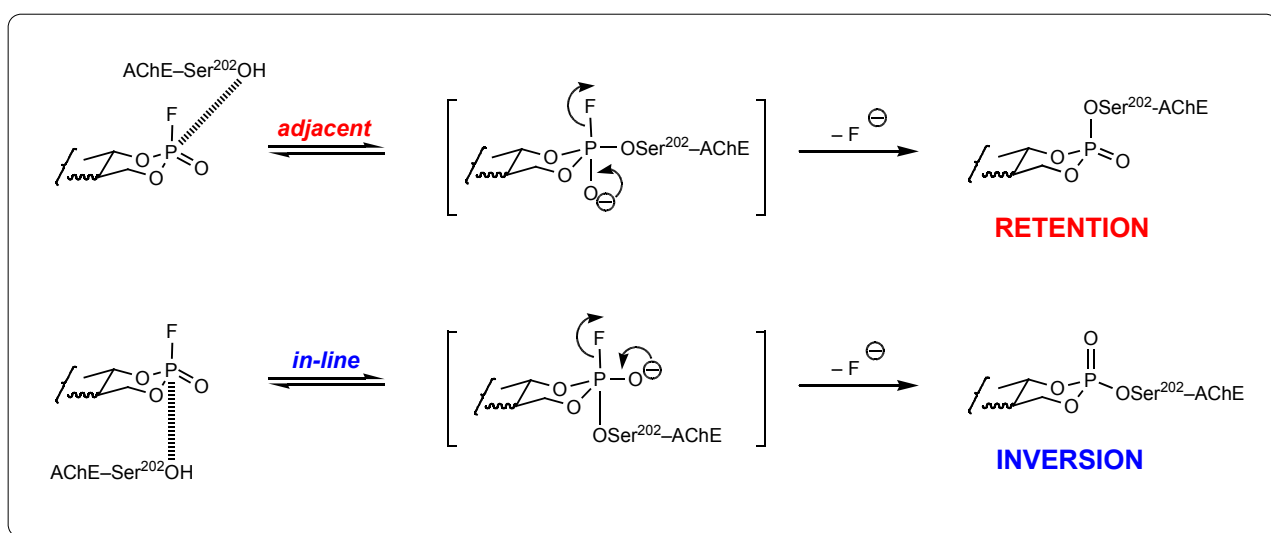
Bei den *cis*-equatorialen Modellverbindungen (deutert [73][74] und nicht-deutert) konnten im wässrigen NMR-LM zudem jeweils beide diastereoisomeren Verbindungen getrennt voneinander detektiert werden, wohingegen in CDCl_3 beide Diastereoisomere die gleiche ^{31}P -chemischen Verschiebung aufwiesen. Bei allen anderen Modellverbindungen wiesen die Diastereoisomeren jeweils in beiden Lösungsmitteln die gleiche ^{31}P -chemische Verschiebung auf. Es wurden auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den chemischen Verschiebungen der deuterten und nicht-deuterten Modellverbindungen festgestellt.

Bei den deuterten *trans*-Modellverbindungen konnte durch $^{31}\text{P}\{^2\text{H}\}$ -NMR Experimente in NMR-LM zudem die zu erwartenden Kopplungen zum CH_2 des Serins gemessen werden. Es wurde jeweils ein Triplett detektiert. Die $^3J(\text{P}, \text{H}_2\text{-C}(3))$ für die axial substituierte *trans*-Modellverbindung betrug 6.2 Hz und für die

equatorial substituierte 5.0 Hz.

Wie man in **Tabelle 21** gut sehen kann, sind die Signale der axialen ZSME-Modellverbindungen gegenüber den equatorialen durchgehend tieffeld-verschoben. Und dies jeweils um rund 1 ppm. Die Hydrolyseprodukte für die *trans*- und *cis*-Decaline sind glücklicherweise gegenüber den Modellverbindungen stark tieffeld-verschoben, sodass Verwechslungen ausgeschlossen werden können.

5.9.2 Resultate der $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Experimente an phosphorylierter AChE und Bestimmung des stereochemischen Verlaufs der Inhibitionsreaktion



Schema 31: Allgemeines Schema für den stereochemischen Verlauf der Inhibitionsreaktionen.

FUREGATI [76][77] entwickelte eine reproduzierbare Methode, mit welcher eine Untersuchung der Enzym-Inhibitor-Addukte in Lösung mittels ^{31}P -NMR Spektroskopie möglich ist. Nur wenn das phosphorylierte Enzym in denaturierter Form vorliegt, kann ein scharfes Signal im NMR erhalten werden. Im **Kapitel 4.3** (S. 34 ff.) ist – anhand der Inhibition der AChE mit DFP – die Entwicklung der Methode beschrieben und in **Abbildung 8** (S. 34) sind die ^{31}P -NMR Spektren vor und nach der Denaturierung mit Guanidin- d_5 -DCl in D_2O gezeigt. Die Inhibition mit DFP ist ein

generell akzeptiertes Kriterium zur Identifizierung aller Serinhydrolasen [44] und eignet sich deshalb gut für die Etablierung der Methode. Zudem sind die Resultate von FUREGATI gleichzeitig die Bestätigung, dass über die Analogie der chemischen Verschiebungen (Vergleich mit Modellverbindungen) sinnvolle Aussagen über das vorliegende Enzym-Inhibitor-Addukt gemacht werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, die Ergebnisse von FUREGATI mit (\pm)-**5ax** zu reproduzieren. Dies gelang ohne grössere Probleme. Es wurde Retention und Inversion der Konfiguration am Phosphor für die Inhibitionsreaktion gefunden (vgl. **Abbildung 10** links, S. 37). Einziger Unterschied war, dass bei der Dialyse – auch nach 48 h – das anorganische Phosphat P^i nicht vollständig entfernt werden konnte.

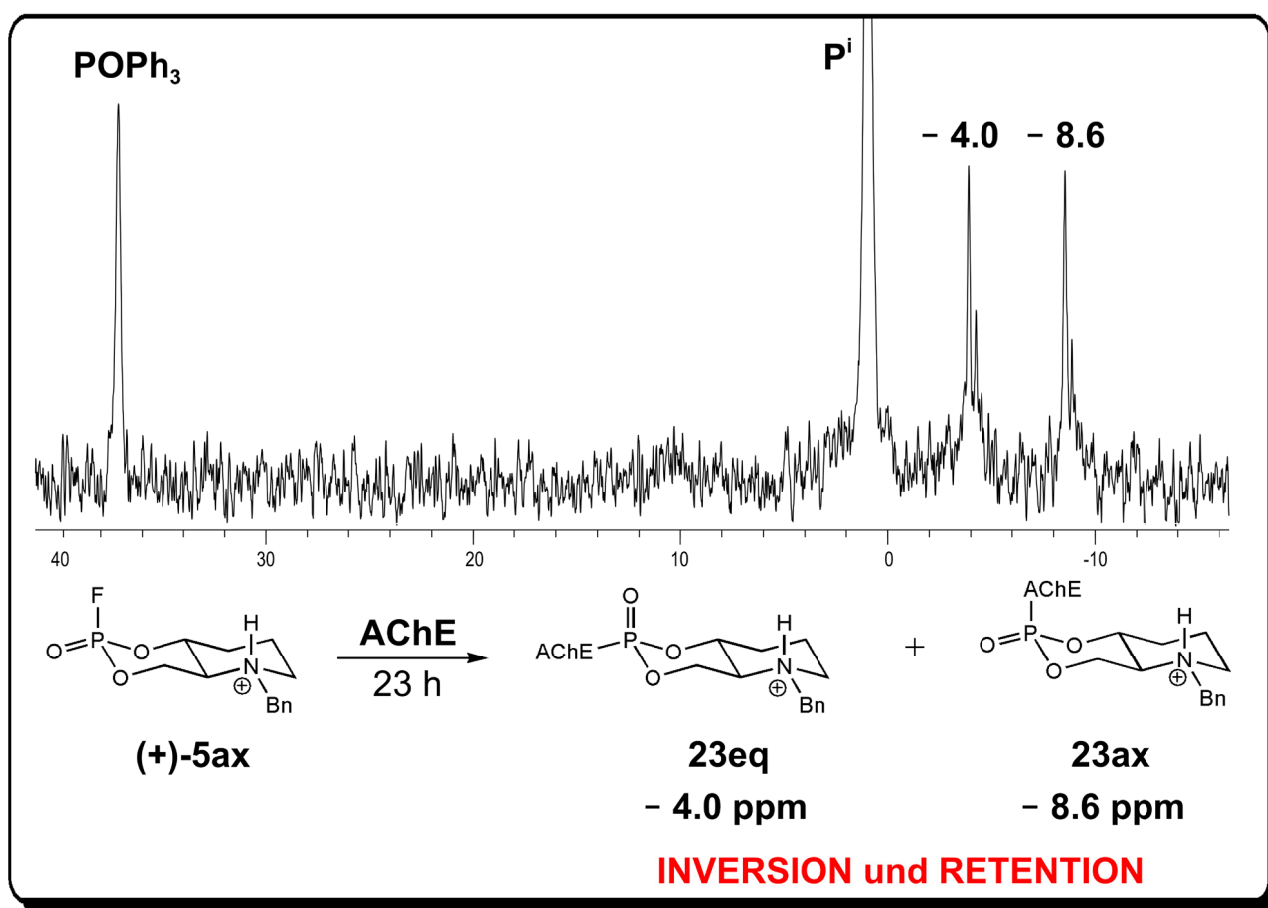


Abbildung 52: $^{31}P\{^1H\}$ -NMR von mit (+)-**5ax** inhibierter EeAChE (202.5 MHz, 300K, $pH^* = 4.00 \pm 0.02$, 105'000 scans). Die Inhibitionsreaktion läuft unter Inversion und Retention, wie auch in [77] für das Racemat beschrieben ist.

Als nächstes interessierte natürlich, ob sich die enantiomeren Verbindungen in Bezug auf den stereochemischen Verlauf der Inhibition anders verhalten, als das Racemat. Um dies zu überprüfen, wurde die AChE mit (+)-**5ax** inhibiert (23 h) und das Enzym-Inhibitor-Addukt nach der Aufreinigung (Dialyse gegen TRIS-Puffer, pH \approx 7.7) in 240 μ l wässrigem NMR-LM (Guanidin- d_5 -DCI (6 M), NaOAc \cdot 3H $_2$ O (50 mM) und POPh $_3$ (208 μ M) in D $_2$ O) gelöst. In **Abbildung 52** ist das 31 P-NMR Spektrum der Enzym-Inhibitor-Addukte gezeigt. Es wurden wie schon beim Racemat zwei Signale bei – 4.0 (**23eq**) und – 8.6 ppm (**23ax**) detektiert. Wenn man die Signale aus **Abbildung 52** mit denjenigen aus **Abbildung 10** (links) vergleicht, stellt man keine signifikanten Unterschiede fest. Das Resultat widerlegt auch gleich die Vermutung, dass es sich bei den kleineren Signalen, rechts neben den Hauptsignalen (– 4.0 und – 8.6 ppm), um die jeweiligen diastereoisomeren Enzym-Inhibitor-Addukte (nur im Racemat möglich) handeln könnte. Die Vermutung liegt näher, dass es sich dabei um verschiedene Konformationen der inhibierten Enzymspezies handelt.

Die Intensität der Signale der Enzym-Inhibitor-Addukte ist sehr hoch, wenn man sie mit der internen Referenz POPh $_3$ vergleicht, die die ungefähre Konzentration an katalytisch aktiven Stellen des Enzympräparats angibt. Es ist also anzunehmen, dass sämtliche aktiven Stellen mit Inhibitor besetzt sind. Dies spricht für eine relativ hohe Stabilität des Enzym-Inhibitor-Adduktes. k_6 (Hydrolysegeschwindigkeit des Enzym-Inhibitor Komplexes) ist mit $0.00084 \pm 0.00024 \text{ s}^{-1}$ (vgl. **Tabelle 19**, S. 136) auch nicht besonders gross, verglichen mit den meisten carbocyclischen Inhibitoren.

Es war an dieser Stelle nicht anzunehmen, dass sich die anderen enantiomeren Acetylcholinmimetika (7-Aza, Typ **III**) in Bezug auf den stereochemischen Verlauf der Inhibitionsreaktion anders verhalten sollten als die Racemate. Deshalb wurden keine weiteren Inhibitionsversuche mit den 7-Aza-Acetylcholinmimetika durchgeführt.

Stattdessen wurden die carbocyclischen Inhibitoren untersucht, welche eine viel stärkere Stereoselektivität bezüglich der Enzyminhibition zeigen (siehe Enzymkinetik, **Kapitel 5.8.4, Tabelle 18**, S. 135).

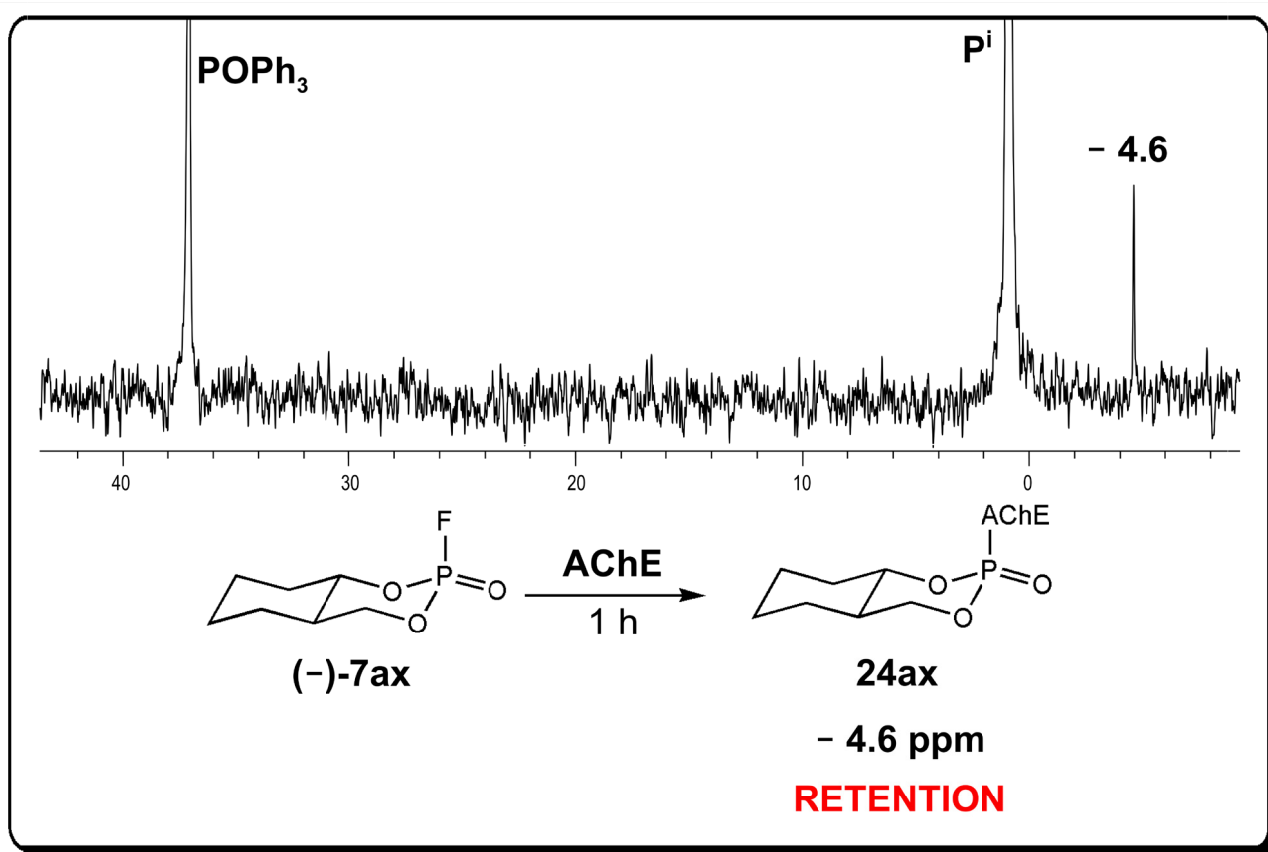


Abbildung 53: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR von mit **(-)-7ax** inhibierter EeAChE (202.5 MHz, 300K, $\text{pH}^* = 4.00 \pm 0.02$, 105'000 scans). Die Inhibitionsreaktion läuft unter Retention.

Zuerst wurde die AChE mit **(-)-7ax** inhibiert. Die Inhibition war nach nur 1 h Stunde vollständig abgelaufen. Die ersten Versuche, ein ^{31}P -NMR Signal für das Enzym-Inhibitor-Addukt zu erhalten, scheiterten, da der Enzym-Inhibitor-Komplex innerhalb der 48-stündigen Dialyse vollständig hydrolysierte. Dieser Umstand konnte diagnostisch mittels Enzymkinetik nicht festgestellt werden, da der Inhibitor das ganze Enzym so schnell inhibiert, dass man der Verlaufskurve über 10 Minuten die temporäre Hydrolyse nicht ansieht. Zudem wird beim enzymkinetischen *assay* mit einem *ca.* 1'250'000-fachen Überschuss an Inhibitor gearbeitet und bei der Probenvorbereitung für die NMR-Untersuchungen nur mit einem *ca.* 100 – 1000-fachen Überschuss. Der Inhibitor ist also bei der Probenvorbereitung viel schneller aufgebraucht als bei der Enzymkinetik. Der beste *fit* bei der kinetischen Auswertung der Verlaufskurven entspricht richtigerweise dem Mechanismus **1A**, da alleine aus

der enzymkinetischen Analyse des Inhibitors über 10 Minuten ein $k_6 \approx 0$ hervorgeht. Die Zugänglichkeit für Wasser scheint aufgrund der geringeren Grösse der carbocyclischen Inhibitoren grösser zu sein als bei den 7-Aza-Acetylcholinmimetika. Um dieses Problem in den Griff zu bekommen, wurde die Dialysezeit auf 4 h gesenkt. Trotz dieser kurzen Dialysezeit konnte das Hydrolyseprodukt vollständig entfernt werden. Nur das anorganische Phosphat war nach wie vor zu sehen, welches aber die Analysen aufgrund seiner günstigen chemischen Verschiebung (+ 0.9 ppm) nicht störte.

Abbildung 53 zeigt das ^{31}P -NMR Spektrum des Enzym-Inhibitor-Adduktes. Wenn man die chemische Verschiebung des Enzym-Inhibitor-Komplexes bei -4.6 ppm (**24ax**) mit den chemischen Verschiebungen der Modellverbindungen in **Tabelle 21** (S. 139) vergleicht, kommt man zur Schlussfolgerung, dass es sich um das axial substituierte Enzym-Inhibitor-Addukt **24ax** handeln muss. Die Reaktion läuft also stereoselektiv unter Retention der Konfiguration am P-Atom ab. Es ist keine Spur vom equatorial substituierten Inhibitor zu sehen. Verglichen mit den 7-Aza ACh-Mimetika ist die Intensität des Signals des Enzym-Inhibitor-Addukts deutlich geringer. Das ist auf die partielle Hydrolyse des Enzym-Inhibitor-Addukts zurückzuführen. Würde man die Dialysezeit noch etwas mehr verringern, bekäme man wahrscheinlich ein intensiveres Signal. In **Schema 32** (S. 149) ist die mechanistische Rationalisierung dieses Resultates gezeigt. Der Angriff des Serin-OH erfolgt *adjacent* zum Fluor-Atom auf das P-Atom. Es wird ein trigonal-bipyramidales Intermediat gebildet (siehe **Schema 31**, S.141) und anschliessend das Fluorid eliminiert.

Nun kam natürlich die Frage auf, ob der enantiomere Inhibitor (+)-**7ax** mit der gleichen Stereoselektivität inhibiert wie (–)-**7ax**. Die Inhibition der AChE mit (+)-**7ax** dauerte – aufgrund seiner geringeren inhibitorischen Potenz – etwas länger, nämlich 2 h anstatt 1 h. Die Dialyse wurde in 4 h durchgeführt. In **Abbildung 54** sieht man das gleiche Resultat wie schon bei (–)-**7ax**. Die chemische Verschiebung bei -4.6 ppm (**25ax**) lässt wiederum auf das axiale Enzym-Inhibitor-Addukt schliessen.

Es gibt also bezüglich des stereochemischen Verlaufs der Inhibition (mechanistisch) keine Unterschiede zwischen den Enantiomeren. Sie unterscheiden sich nur in der Inhibitionsgeschwindigkeit (Unterscheidung zwischen den Enantiomeren durch das Enzym).

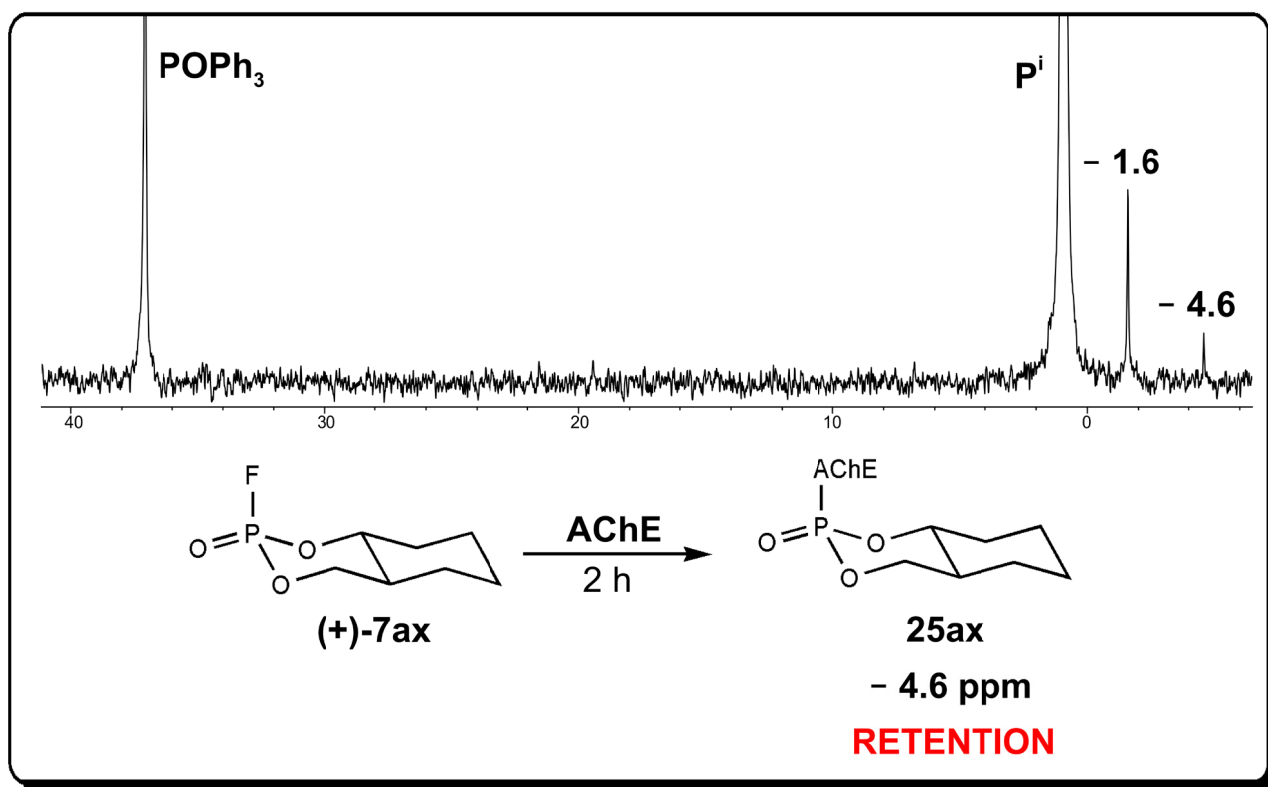


Abbildung 54: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR von mit (+)-7ax inhibierter EeAChE (202.5 MHz, 300K, $\text{pH}^* = 4.00 \pm 0.02$, 205'000 scans). Die Inhibitionsreaktion läuft unter Retention.

Das Signal des Enzym-Inhibitor-Addukts **25ax** in **Abbildung 54** ist einiges weniger intensiv als bei (–)-7ax, und ein deutliches Signal vom Hydrolyseprodukt ist zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass die Hydrolyse des inhibierten Enzyms bei diesem Inhibitor ((+)-7ax) noch schneller läuft als bei (–)-7ax und dadurch mehr Hydrolyseprodukt entstanden ist, welches in der kurzen Zeit der Dialyse nicht herausgefiltert werden konnte. Für die mechanistische Interpretation spielt dies aber keine Rolle.

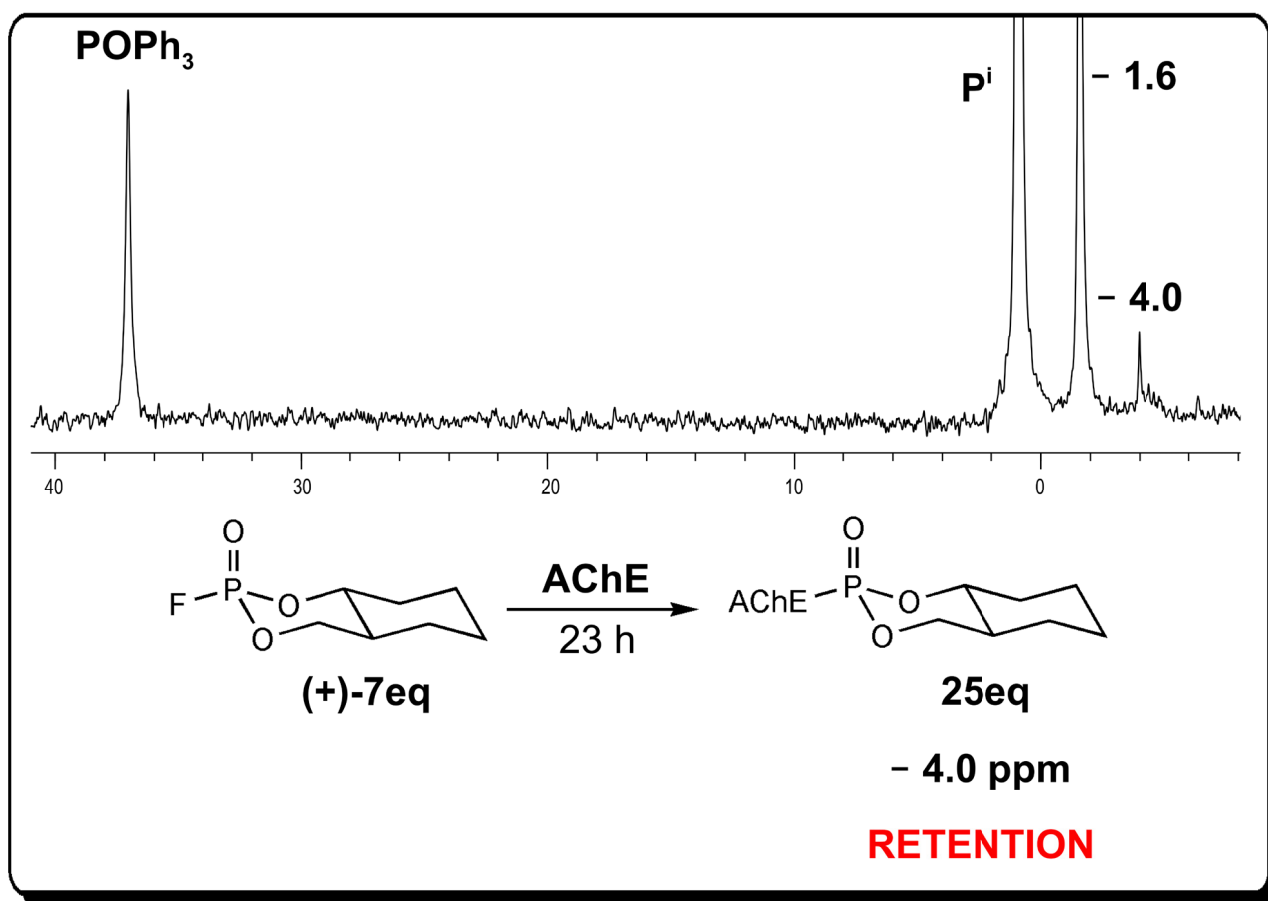


Abbildung 55: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR von mit (+)-7eq inhibierter EeAChE (202.5 MHz, 300K, $\text{pH}^* = 4.00 \pm 0.02$, 105'000 scans). Die Inhibitionsreaktion läuft unter Retention.

Abbildung 55 zeigt das ^{31}P -NMR Spektrum vom Enzym-Inhibitor-Addukt von (+)-7eq mit AChE (25eq). Die Inhibition musste über 23 h durchgeführt werden und es wurden insgesamt 11.2 mg Inhibitor verwendet, was für die carbocyclischen Verbindungen eher viel ist. Dieser Befund kann auch wieder mit der Hydrolyse des Enzym-Inhibitor-Komplexes erklärt werden, denn im ^{31}P -NMR Spektrum sieht man ein noch intensiveres Signal für das Hydrolyseprodukt (-1.6 ppm) als im Falle von (+)-7ax. Nichtsdestotrotz deutet das Signal des Enzym-Inhibitor-Addukts bei -4.0 ppm (25eq) – wenn man es mit der entsprechenden Modellverbindung vergleicht – auf eine Inhibition hin, die unter Retention der Konfiguration am P-Atom abläuft. Bei der mechanistischen Rationalisierung dieses Resultates muss berücksichtigt werden, dass die Verbindung (+)-7eq in Lösung mehrheitlich in einer *Twist-Boat*-

Konformation vorliegt (siehe **Kapitel 5.7.5**, S. 97). Der Angriff des Serin-OH der AChE erfolgt deshalb *adjacent* zum pseudo-axialen Fluor auf den Inhibitor in der *Twist-Boat*-Konformation (siehe **Schema 32**, S. 149).

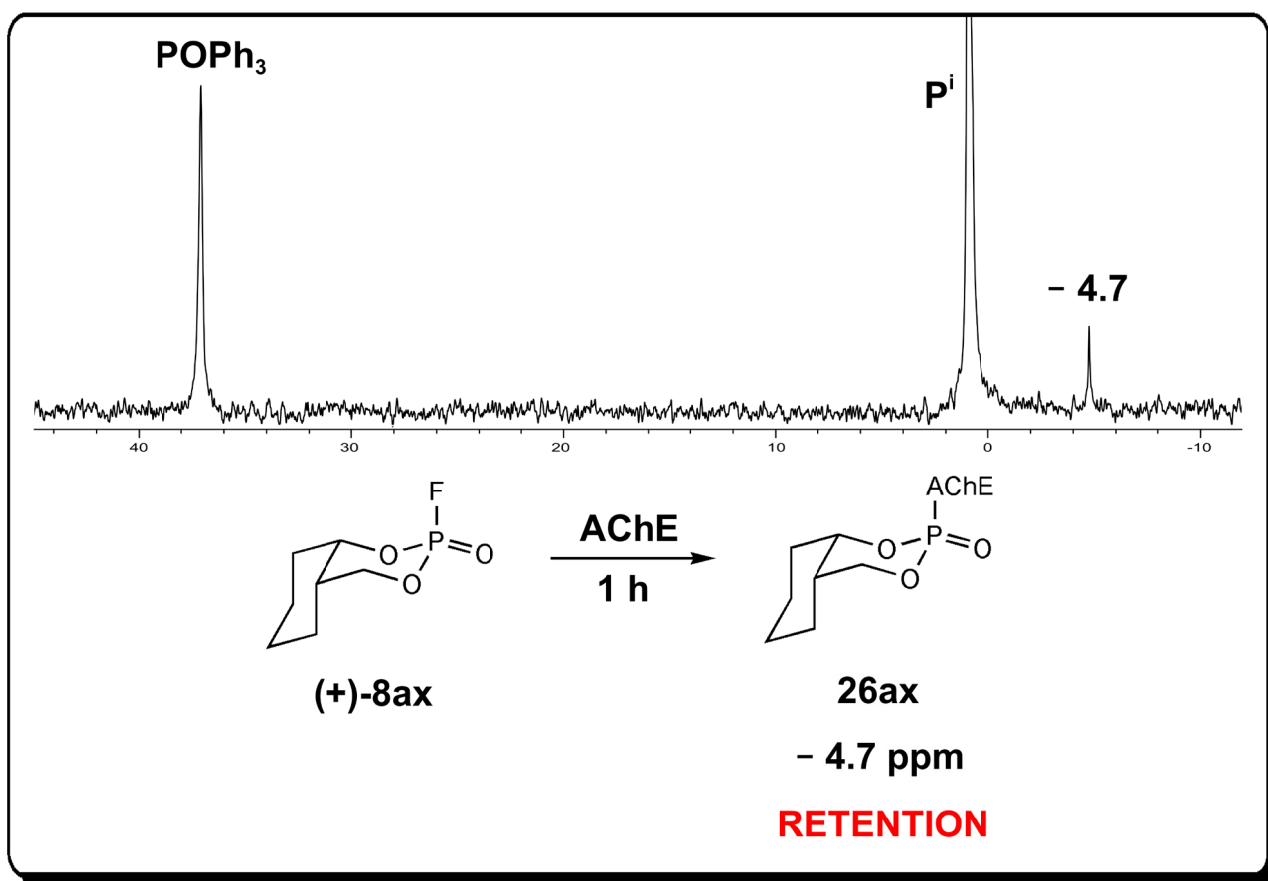


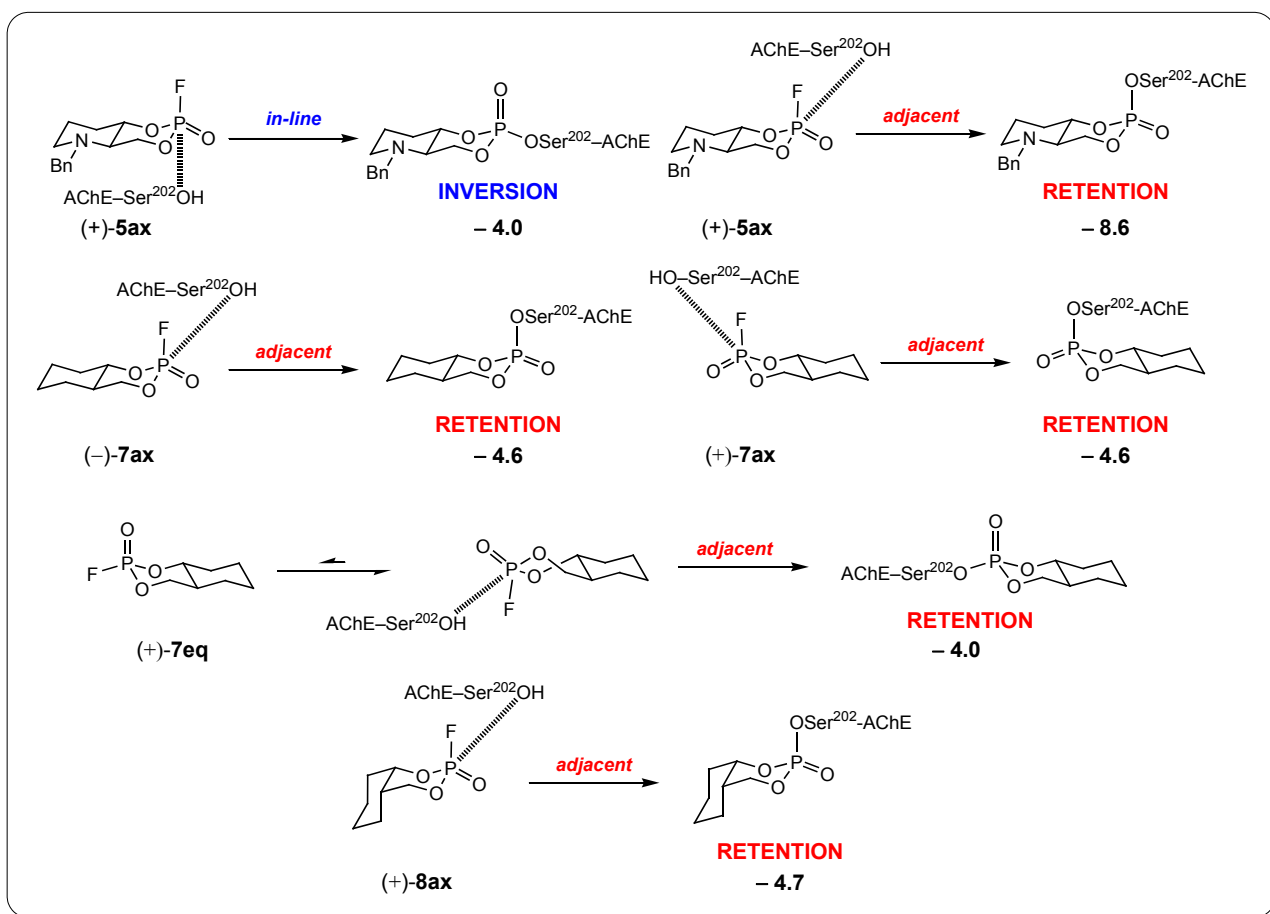
Abbildung 56: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR von mit **(+)-8ax** inhibierter EeAChE (202.5 MHz, 300K, $\text{pH}^* = 4.00 \pm 0.02$, 105'000 scans). Die Inhibitionsreaktion läuft unter *Retention*.

Die totale Inhibition der AChE mit **(+)-8ax** erfolgte wieder innerhalb einer Stunde. Im ^{31}P -NMR Spektrum in **Abbildung 56** ist kein Hydrolyseprodukt zu sehen. Dieses konnte bei der Dialyse vollständig herausgefiltert werden. Das Signal des Enzym-Inhibitor-Addukts bei -4.7 ppm (**26ax**) spricht – verglichen mit den chemischen Verschiebungen der Modellverbindungen – wieder klar für eine Inhibitionsreaktion, welche unter Retention der Konfiguration am P-Atom verläuft. Der Angriff des Serin-OH erfolgt *adjacent* zum Fluor. Das würde man auch intuitiv so erwarten, da der

carbocyclische Ring des *cis*-Decalins aus sterischen Gründen den *in-line* Angriff verhindert.

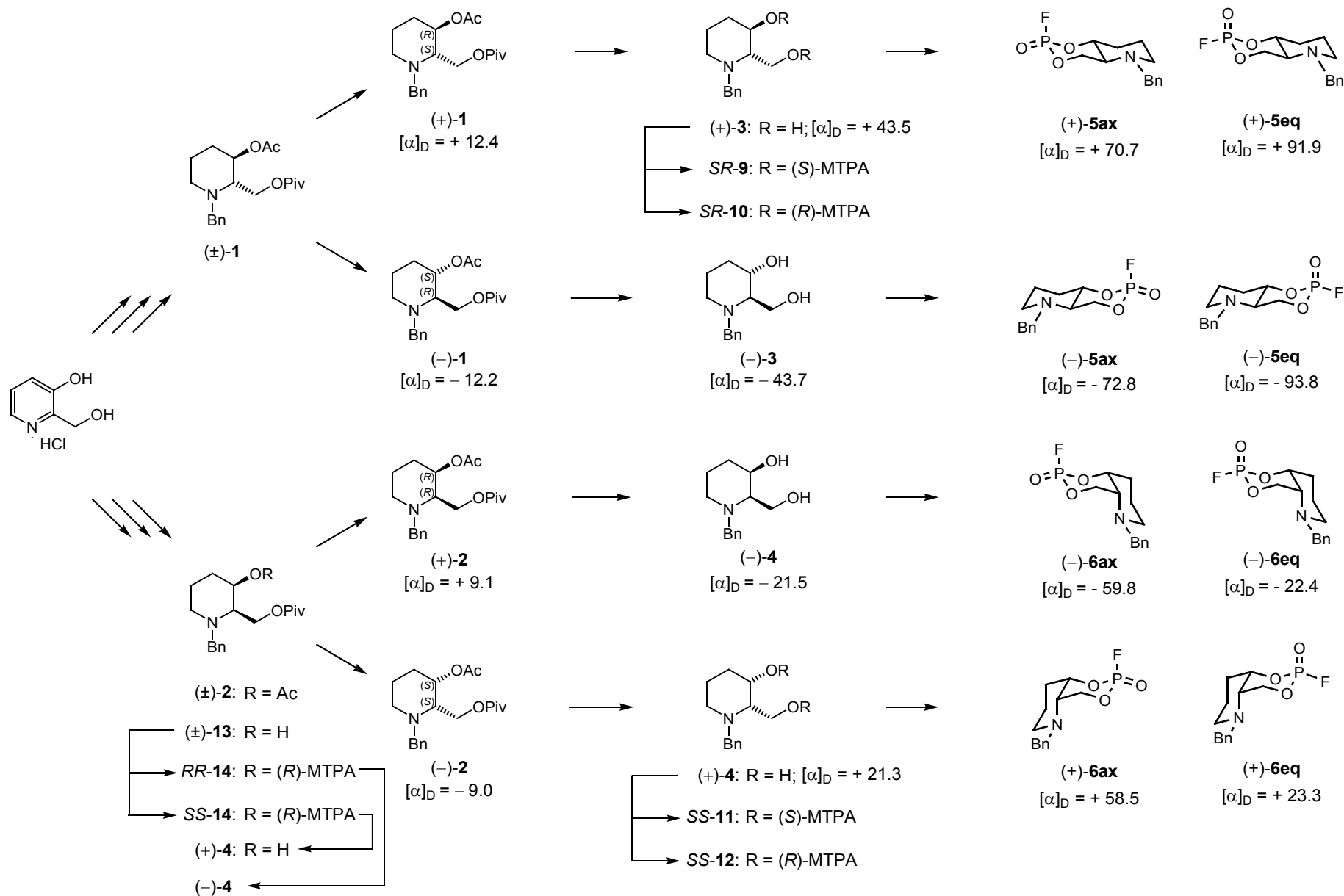
Eine totale Inhibition mit der konformativ sehr spannenden Verbindung (+)-**8eq** konnte leider nicht erreicht werden. Wie schon die enzymkinetischen Analysen ergeben hatten, ist der Inhibitor sehr anfällig auf spontane Hydrolyse und ist zudem nur ein temporärer Inhibitor, was die Verbindung für die ^{31}P -NMR Untersuchungen leider unbrauchbar macht.

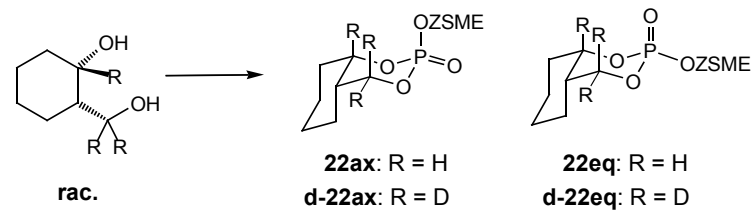
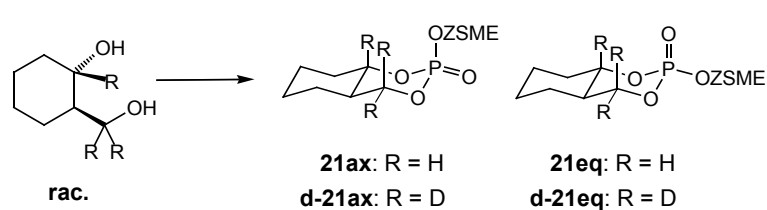
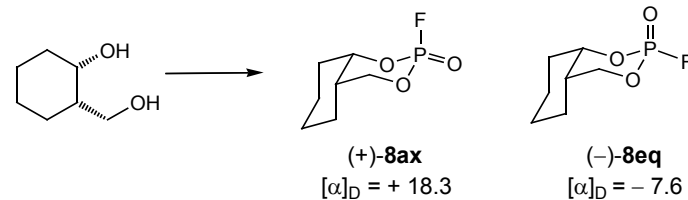
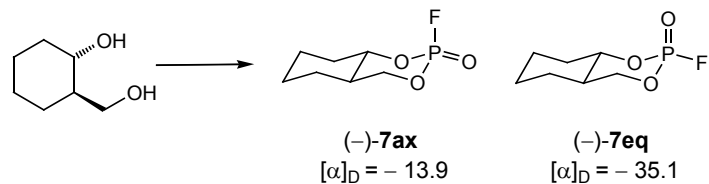
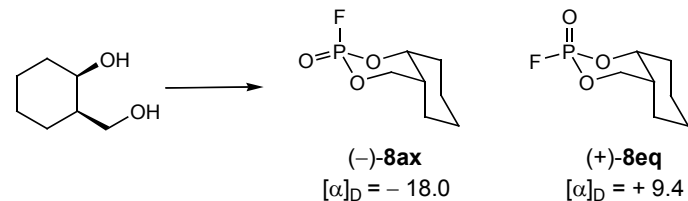
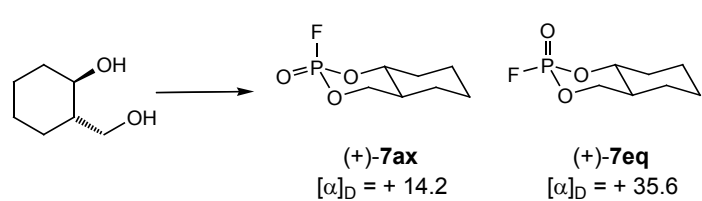
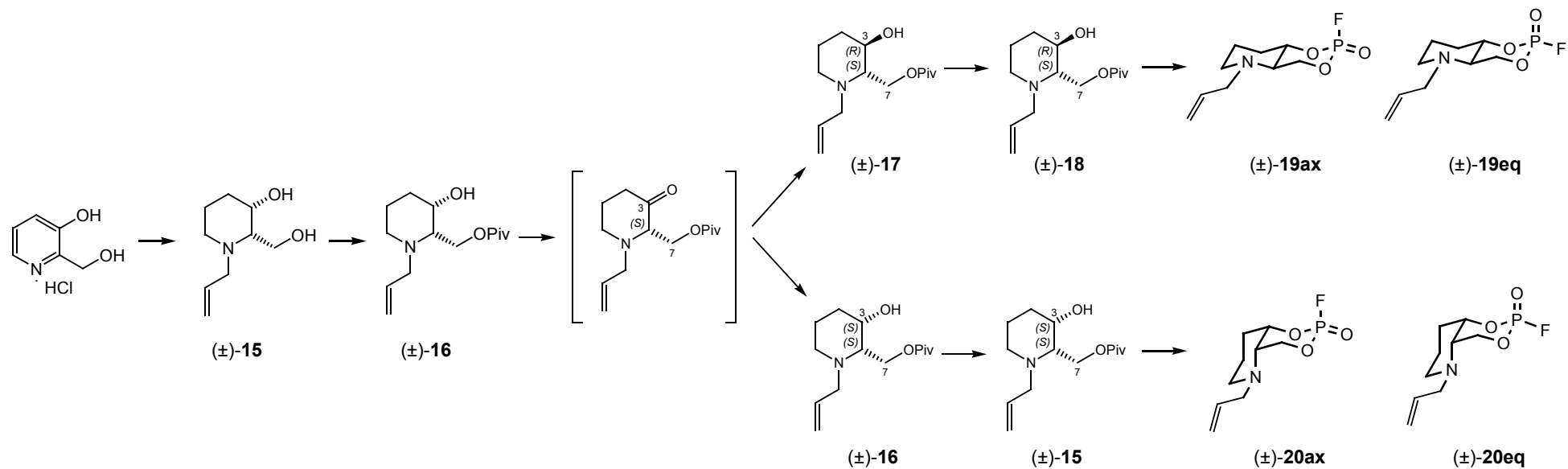
Zusammenfassend kann man sagen, dass alle Inhibitoren des Typs **IV** mechanistisch sehr selektiv mit dem Enzym reagieren. Alle Inhibitionen laufen unter Retention der Konfiguration am P-Atom ab. Der Angriff des Serin-OH erfolgt jeweils *adjacent* zum Fluoratom.



Schema 32: Mechanistische Rationalisierung der Resultate aus den ^{31}P -NMR Experimenten.

5.10 Übersicht zu den synthetisierten Verbindungen





EXPERIMENTELLER TEIL

6. ALLGEMEINES

6.1 Abkürzungen

A

abs. absolutiert

Ac Acetyl

ACh Acetylcholin

AChE Acetylcholinesterase (*EeAChE* von *Electrophorus electricus*;
TcAChE von *Torpedo californica*)

AcOEt Ethylacetat, Essigsäureethylester

anal. analytisch

äq. (Mol)äquivalente

AS Aminosäure oder Aminosäurerest

ATC Acetylthiocholiniodid

ax Index für axial stehende Wasserstoffatome und Substituenten in
Cyclohexan- und Decalingerüsten

B

Bn Benzyl

C

c Konzentration

conc. konzentriert

D

DC Dünnschichtchromatographie

dest. destilliert

DFP Diisopropylfluorophosphat

DMAP 4-(Dimethylamino)pyridin

DTNB 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure-3,3'-6)

E

eq Index für equatorial stehende Wasserstoffatome und Substituenten in Cyclohexan- und Decalingerüsten

Et₂O Diethylether

G

GC Gaschromatographie

ges. gesättigt

H

h Stunde(n)

H₂O Wenn nicht anders vermerkt, ist entionisiertes Wasser gemeint

HV Hochvakuum (ca. 10⁻² Torr)

I

i-PrOH Isopropanol

IFP Isopropylfluorophosphat (gealtertes DFP)

IR Infrarot

K

K Kelvin

k' Kapazitätsfaktor (HPLC)

kat. katalytische Mengen

KG Kieselgel

konz. konzentriert

L

LB *line broadening factor* (NMR)

LM Lösungsmittel

Lsg. Lösung

M

min Minute(n)

MS Massenspektrometrie

MTPA-Cl α -methoxy- α -trifluoromethyl-Phenyllessigsäurechlorid

N

NMR Kernspinresonanz

O

org. organisch

P

PES Polyethersulfon

Pⁱ anorganisches Phosphat

Piv Pivaloyl (Schutzgruppe)

Piv Pivaloyl

PP Phosphatpuffer

präp. präparativ

R

R_f Retentionsfaktor (DC)

RT Raumtemperatur (ca. 22 °C)

RV Rotationsverdampfer

S

s Sekunde(n)

SC Säulenchromatographie

Smp. Schmelzpunkt

T

t Zeit

TB *Twist-Boat*-Konformation

TBME Tertbutylmethylether

TMS Tetramethylsilan bzw. als Substituent Trimethylsilyl

t_R Retentionszeit (GC)

TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Ts 4-Toluolsulfonyl

U

UV Ultraviolett

V

vgl. vergleiche

VIS Sichtbares Licht

v_{max} bei IR-Spektroskopie: Absorptionsmaximum in cm⁻¹

W

wässr. wässrig

Z

Z Benzyloxycarbonyl

ZSME Z-Serinmethylester

6.2 Chemikalien und Lösungsmittel

(-)-Camphansäurechlorid FLUKA 21284 *purum*

2-Oxocyclohexancarbon-
säureethyl-ester MERCK *for Synthesis*

2-(Hydroxymethyl)pyridin-
3-ol Hydrochlorid ALDRICH H3,153-0 *tech.* 85%

4-Brombenzoylchlorid FLUKA 16450 *purum*

5,5'-Dithio-bis(2-nitro-
benzoesäure-3,3'-6) (DTNB) FLUKA 43760 *BioChemika* (ELLMAN's Reagenz [117]).

A

Aceton FLUKA *p.a.*

Aceton-d₆ Cambridge Isotope Laboratories

Acetonitril FLUKA 00695 absolut über Molekularsieb

Acetylthiocholin (ATC) FLUKA 01480 *BioChemika*

Allylbromid FLUKA 05860 *puriss.* ≥ 99.0%

Ammoniumfluorid FLUKA 09737 *puriss. p.a.*

B

Benzol-d₆ Cambridge Isotope Laboratories

Benzylbromid FLUKA 13250 *purum*

C

CDCl₃ Cambridge Isotope Laboratories

Chloroform SCHARLAU *n.g.*, stabilisiert mit EtOH

D

D ₂ O	Cambridge Isotope Laboratories
DCl	Cambridge Isotope Laboratories
Dichlormethan <i>techn.</i>	Über CaH ₂ destilliert
Diethylether <i>techn.</i>	über Na ⁰ /Benzophenon destilliert
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	FLUKA 38399 <i>pract.</i>
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	MERCK 6580 <i>p.a.</i>
DMAP	FLUKA 39405 <i>purum</i>
DMSO	FLUKA 11320 <i>puriss.</i>

E

EeAChE	SIGMA C-2888 verschiedene <i>lots</i> (vgl. Kapitel 8 und 9)
Ethanol	FLUKA <i>p.a.</i> ; für anal. HPLC: <i>hplc grade</i>
Ethylacetat <i>techn.</i>	über K ₂ CO ₃ destilliert

H

HCl	MERCK <i>p.a.</i>
Hexan <i>techn.</i>	über NaH destilliert, für anal. HPLC: <i>hplc grade</i>

I

Isopropanol	In technischer Qualität eingesetzt (Kühlmittel)
Lithiumaluminiumhydrid	FLUKA, <i>purum</i>

M

Methanol	MERCK <i>p.a.</i>
----------	-------------------

N

NaOD	Cambridge Isotope Laboratories
Natriumborhydrid	FLUKA <i>purum p.a.</i>
Natriumchlorid	FLUKA 71378 <i>BioChemika MicroSelect</i>
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	MERCK 6346 <i>p.a.</i>
Natriumhydroxid Plättchen	ERNE <i>purum</i>

O

Oxalylchlorid	FLUKA 75760
---------------	-------------

P

Phosphoroxychlorid	FLUKA, <i>purum</i>
Pivaloylchlorid	FLUKA 80910 <i>purum</i>
Pluronic F-68	SIGMA P-1300 lot 88H1000
Pyridin	über KOH destilliert und über Molekularsieb (4Å) aufbewahrt

R

Rhodium 5% auf Al ₂ O ₃	ENGELHARD 4824 <i>batch</i> 421243
---	------------------------------------

T

TBME	MERCK <i>for chromatography</i>
Toluol	FLUKA <i>p.a.</i>
Triethylamin	FLUKA 90340 <i>puriss. p.a.</i>
TRIS	FLUKA 93349 <i>Biochemika MicroSelect</i>

W

Wasser	FLUKA 95304, HPLC-Qualität
--------	----------------------------

Z

ZSME	ALDRICH 469165 (95%)
------	----------------------

6.3 Handhabung der Substanzen

Die Reaktionen zu den Phosphadecalinen wurden alle unter Stickstoffatmosphäre in vorher ausgeheizten Glaswaren durchgeführt. Die Phosphorverbindungen wurden unter Argon im Kühlschrank (-20°C) gelagert.

Zudem neigen die equatorial substituierten Fluorophosphate dazu, in chlorierten Lösungsmitteln rasch zu epimerisieren. Deshalb wurde bei den Analysen der Phosphadecaline auf CDCl_3 verzichtet und stattdessen in wasserfreiem Aceton- d_6 bzw. in Benzol- d_6 gearbeitet.

Die sehr feuchtigkeitsempfindliche Substanz POCl_2F wurde in der *glove box* (BRAUN Labmaster 130) im Kühlschrank unter N_2 aufbewahrt. POCl_2F wurde ebenfalls in der *glove box* pipettiert.

Die nicht-kristallinen, hochviskosen Produkte wurden über Nacht am HV ($\sim 10^{-2}$ Torr) unter ständigem Drehen (Kugelrohrapparatur) getrocknet, so dass eine zuverlässige Ausbeute angegeben werden konnte.

Die LM wurden am RV bei 40°C Wasserbadtemperatur unter Vakuum abdestilliert. Bei den Fluorophosphaten wurde das LM abgeblasen, um der Epimerisierung vorzubeugen. Alle Produkte wurden am HV ($\sim 10^{-2}$ Torr) getrocknet.

Der Phosphatpuffer für die enzymkinetischen Messungen wurde vor jedem Gebrauch filtriert (Spritzenfilter (TITAN): $\varnothing = 30$ mm, Filtrationsvolumen $< 150\text{ml}$, Filtrationsverlust $< 139\text{ }\mu\text{l}$, maximaler Arbeitsdruck 90 Psi, PES-Membran, Porengrösse = $0,2\text{ }\mu\text{m}$), da der PP eine ideale Nährlösung für Mikroben ist, welche die Messungen erheblich stören können.

Die Volumen $\leq 1\text{ml}$ für die Enzym-assays wurden jeweils mittels Mikroliter SOCOREX-Pipetten S+ ($100 - 1000\text{ }\mu\text{l}$) und mit SOCOREX *Autoclavable Calibra* 822 ($10 - 100\text{ }\mu\text{l}$, $1 - 10\text{ }\mu\text{l}$, $0,4 - 2\text{ }\mu\text{l}$) genau bestimmt.

6.4 Bemerkungen zu den stereochemischen Angaben

Die absoluten Konfigurationen der Verbindungen wurden mit (*R*) und (*S*) bezeichnet, zusätzlich zu den Deskriptoren "*cis*, *trans*, axial bzw. equatorial".

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei den racemischen Verbindungen immer nur eine der beiden enantiomeren Strukturen gezeichnet. Zudem wurden die Racemate jeweils mit '(±)' gekennzeichnet.

Bei der Zuordnung der Prioritäten am P-Atom ist zu beachten, dass "Beiträge von *d*-Orbitalen an den Bindungen quadriliganter Atome vernachlässigt werden" [135]. Für die Organophosphate der vorliegenden Arbeit bedeutet das, dass dem Oxo-Sauerstoff die niedrigste Priorität zukommt.

6.5 Chromatographische Verfahren

DC: DC-Platten MERCK Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium. Die Substanzflecken wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm), durch Besprühen mit SCHLITTLER-Reagenz, durch Eintauchen in KMnO₄-Lsg. oder Mostain-Lsg. und anschliessendes Erhitzen sichtbar gemacht.

Herstellung des SCHLITTLER-Reagenz': 1g Hexachlorplatinsäure (H₂PtCl₆) in 6 ml H₂O lösen und mit 20 ml 1 M HCl verdünnen (Lösung A). 22.5 g Kaliumiodid in 250 ml H₂O lösen (Lösung B). Die Lösungen A und B zusammengeben und mit H₂O auf 1000 ml verdünnen.

Herstellung der KMnO₄-Lsg.: Mischen von je einem Teil 1% wässr. KMnO₄-Lsg. und 5% wässr. Na₂CO₃-Lsg.

Herstellung der Mostain-Lsg.: Lösen von 15 g (NH₄)Mo₇O₂₄ • 4 H₂O und 0.3 g Ce(SO₄)₂ • 4 H₂O in 300 ml 10% H₂SO₄.

SC: Falls nicht anders angegeben, wurde für die Säulenchromatographie MERCK Kieselgel 60, F₂₅₄, 40 – 63 µm verwendet.

Zur Trennung der benzylgeschützten *cis*-/*trans*-Diester und der allylgeschützten

cis-/trans-Hydroxyester wurde MERCK Kiesegel 60, F₂₅₄, 15 – 40 µm eingesetzt.

Die axialen und equatorialen Epimere der Fluoridate wurden auf MERCK Kiesegel 60, F₂₅₄, 15 – 40 µm getrennt, welches zuvor gemäss [73] mit 1 M HCl behandelt worden war, so dass eine wässrige Aufschlämmung (10%) einen pH-Wert von 5.7 aufwies.

In der Regel wurde unter leichtem N₂-Überdruck gearbeitet (< 1 bar).

Analytische HPLC: Säule: CHIRALCEL[®] OD-H (Länge: 250 mm, Durchmesser: 4.6 mm, Partikelgrösse: 5 µm), Pumpe: PHARMACIA LKB *HPLC Pump* 2248, Detektor: HEWLETT PACKARD 1040A *HPLC Detection System, Diode Array Spectrometer*, Auswertung: HEWLETT PACKARD *Chem Station for LC, Rev. A.04.02*.

Charakterisierung der Substanzen mittels Angabe des k'-Wertes (Kapazitätsfaktor). Die verwendeten HPLC Parameter sind in den **Gleichungen 4, 5** und **6** auf S. 48 beschrieben.

Präparative HPLC: Säule: CHIRALCEL[®] OD (Länge: 250 mm, Durchmesser: 20 mm, Partikelgrösse: 10 µm), Pumpe: APPLIED BIOSYSTEMS 400 *Solvent Delivery System*, Detektor: APPLIED BIOSYSTEMS 783A *Programmable Absorbance Detector*, Plotter: KONTRON AG, Tarkan *W+W Recorder* 600.

GC-MS: HEWLETT PACKARD 5890 Gas-Chromatograph mit Kapillarsäule HP1 (Phenyl(1%)-Methylsiloxan *cross-linked*, Länge: 25 m, Durchmesser: 0.2 mm, Filmdicke: 0.53 µm), ausgerüstet mit MS(EI)-Detektor HEWLETT PACKARD 5971. Als Trägergas wurde He verwendet.

Wenn nicht anders angegeben, war der Temperaturgradient des Säulenofens wie folgt: 2 min 100°C, Aufheizen auf 240°C mit 20°C/min und abschliessend 10 min auf 240°C.

Diastereoisomeren/Enantiomerenüberschuss-Bestimmung (*de/ee*): Die Bestimmung dieser Werte erfolgte mittels analytischer HPLC (CHIRALCEL[®] OD-H) durch Integration der basisgetrennten Signalflächen (Bsp. für das Enantiomer der absoluten Konfiguration *R* bzw. für das Diastereomer mit der absoluten Konfiguration *RS*):

$$ee_R = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \cdot 100(\%)$$
$$de_{RS} = \frac{[RS] - [SS]}{[RS] + [SS]} \cdot 100(\%)$$

6.6 Schmelzpunkte

Smp: METTLER FP5/52, unkorrigiert.

6.7 pH-Messungen

pH: KNICK Portamess 762 Calimatic. Elektrode: METTLER InLab 423 S7.

Eichpuffer: METTLER Standardpuffer pH 4.01 und METTLER Standardpuffer pH 7.00.

Elektrolyt: METTLER Elektrolyt 3 M KCl gesättigt mit AgCl.

Die pH-Werte wurden bei RT (*ca.* 22°) gemessen; eine Genauigkeit von ± 0.02 wurde eingehalten.

6.8 Spektroskopische Methoden und Geräte

UV/VIS-Spektroskopie: Ein HEWLETT-PACKARD 8452 A, *Diode Array Spectrometer*, wurde für die Enzymkinetik eingesetzt. Es wurde mit MS-DOS UV/VIS Software gearbeitet.

IR-Spektren: PERKIN ELMER Paragon 1000 PC, FT-IR-Spektrometer. Messungen als Film oder KBr-Pressling. ν_{\max} wird in cm^{-1} angegeben, und die Bandenintensitäten werden mit *s* = stark, *m* = mittel und *w* = schwach bezeichnet; br bedeutet eine breite Bande.

NMR-Spektrometrie: Die Routinemessungen wurden in Standardröhrchen mit 5 mm Durchmesser mit *ca.* 0.1 mmol Substanz in einem Probevolumen von *ca.* 600 µl durchgeführt.

Die Multiplizitäten und die Spinsysteme wurden in der üblichen Nomenklatur angegeben: *s* Singulett, *d* Dublett, *t* Triplett, *q* Quadruplett, *quint* Quintett, *m* Multiplett, *m_c* zentriertes Multiplett, *etc.* und der Absolutbetrag der Kopplungskonstanten *J* in Hz.

¹H-NMR-Spektren: BRUKER ARX 300 (300 MHz), AV2 400 (400 MHz) und AV2 500 (500 MHz). Die ¹H-NMR-Spektren wurden bei 300 K gemessen. Die chemischen Verschiebungen δ (in ppm) in CDCl₃ sind auf Tetramethylsilan (TMS, δ = 0.00 ppm) als interne Referenz bezogen. Bei den Spektren in Aceton-d₆ wurde das Acetonsignal (δ = 2.05 [136], *quint.*, $^2J_{\text{HD}}$ = 2.2 Hz). H_a und H_e kennzeichnen axial bzw. equatorial stehende Wasserstoffatome.

Die Zuordnung der Signale erfolgte wenn nötig mittels COSY- und HSQC-Spektren. Zudem wurden diverse Entkopplungsexperimente (z. B. ¹H{³¹P}- bzw. ¹H{¹⁹F}-NMR Spektren) durchgeführt, um die Kopplungen von P- und F-Atomen bei den Fluoridaten zuzuordnen.

Zur Konformationsanalyse der Decalinsysteme wurden vor allem NOESY-Spektren aufgenommen.

¹³C-NMR-Spektren: BRUKER ARX 300 (75 MHz). Die ¹³C-NMR-Spektren wurden bei 300 K gemessen. CDCl₃ (δ = 77.00 ppm, *t*, $^1J_{\text{CD}}$ = 31.5 Hz) oder TMS (δ = 0.00 ppm) dienten als interner Standard. Bei den Spektren in Aceton-d₆ wurde das Acetonsignal (δ = 29.92 [136], *sept.*, $^1J_{\text{CD}}$ = 19.4 Hz) als Referenz benutzt. Alle ¹³C-NMR-Spektren sind ¹H-entkoppelt, dies wird jeweils nicht speziell angegeben.

Die Zuordnung von C, CH, CH₂ und CH₃ erfolgte mit Hilfe von DEPT-135 und wenn nötig anhand von HSQC-Spektren.

^{31}P -NMR-Spektren: Die $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren wurden am BRUKER ARX 300 (121.4 MHz) bei 300 K gemessen. Die ^1H -gekoppelten ^{31}P -NMR-Experimente wurden am BRUKER AV 400 (161.9 MHz) bei 300 K durchgeführt.

Als externer Standard diente 85% H_3PO_4 ($\delta = 0.00$ ppm). Die Kopplungskonstanten J_{PH} sind in Hz angegeben (Absolutbetrag).

Die $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren der Enzymexperimente wurden am BRUKER AV 500 (202.4 MHz) bei 300 K in SHIGEMI-Röhrchen mit 240 μl Probenvolumen gemessen (ca. 90'000 Pulse, BBO-Probenkopf); LB = 10. Als NMR-LM diente D_2O mit Guanidin- $\text{d}_5 \cdot \text{DCI}$ (6 M), $\text{NaOAc} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (50 mM), POPh_3 (208 μM) bei $\text{pH} = 4.00 \pm 0.02$. Als interner Standard diente POPh_3 ($\delta = +37.1$ ppm), das auf 80% H_3PO_4 ($\delta = 0.00$ ppm) als externen Standard geeicht wurde. Die Modellverbindungen wurden im gleichen NMR-LM mit POPh_3 als internem Standard bei 300 K gemessen.

^{19}F -NMR-Spektren: Die $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren wurden am BRUKER ARX 300 (282.2 MHz) bei 300 K gemessen. Die ^1H -gekoppelten ^{19}F -NMR-Experimente wurden am BRUKER AV 400 (376.3 MHz) bei 300 K durchgeführt.

Als externer Standard diente CFCl_3 ($\delta = 0.00$ ppm).

Optische Drehung $[\alpha]_{\text{D}}$: PERKIN ELMER 241 MC Polarimeter. Na-Lampe, $\lambda = 589$ nm, Energie ca. 60 μA DC. Thermostatisierte Zelle, 25° . Zellenlänge $d = 1$ dm, $c = \text{g}/100$ ml, abgelesen wird $\pm \bar{\alpha}$. Der angegebene $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -Wert berechnet sich aus diesen Angaben wie folgt:

$$[\alpha] = 100 \cdot \frac{\bar{\alpha}}{c \cdot d}$$

6.9 Röntgenstrukturanalysen

Die Angaben wurden unübersetzt aus den Berichten von LINDEN übernommen:

Figure Captions

ORTEP [137] representation of the molecule (50% probability ellipsoids; H-atoms given arbitrary displacement parameters for clarity)

Definition of Terms

Function minimized: $\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2$

where $w = [\sigma^2(F_o^2) + (aP)^2 + bP]^{-1}$ and $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$

$$F_o^2 = S(C - RB) / Lp$$

and $\sigma^2(F_o^2) = S^2(C + R^2B) / Lp^2$

S = Scan rate

C = Total integrated peak count

R = Ratio of scan time to background counting time

B = Total background count

Lp = Lorentz-polarization factor

R-factors: $R_{\text{int}} = \Sigma |<F_o^2> - F_o^2| / \Sigma F_o^2$

summed only over reflections for which more than one symmetry equivalent was measured.

$$R(F) = \Sigma ||F_o| - |F_c|| / \Sigma |F_o|$$

summed over all observed reflections.

$$wR(F^2) = [\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \Sigma w(F_o^2)^2]^{1/2}$$

summed over all reflections.

Standard deviation of an observation of unit weight (goodness of fit):

$$[\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (N_o - N_v)]^{1/2}$$

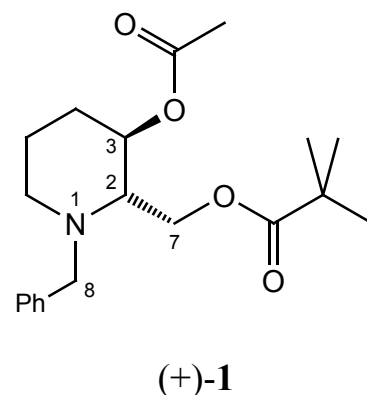
where N_o = number of observations; N_v = number of variables

7. ARBEITSVORSCHRIFTEN UND PHYSIKALISCHE DATEN

7.1 Herstellung der optisch aktiven *N*-benzylierten *cis*- und *trans*-Diester

7.1.1 (+)-*trans*-(2*S*,3*R*)-3-(Acetyloxy)-1-benzyl-piperidin-2-yl-methyl 2,2-Dimethylpropanoat

C₂₀H₂₉NO₄ (347.5)



Nach [88] wurde das Diastereoisomerengemisch *cis/trans*-1-Benzyl-3-hydroxypiperidin-2-yl 2,2-Dimethylpropanoat (1:1) acetyliert und säulenchromatographisch zu den Epimeren *cis*-(±)-**2** und *trans*-(±)-**1** getrennt.

Das Enantiomerengemisch von *trans*-(±)-**1** wurde mittels präp. HPLC (CHIRALCEL[®] OD) mit dem Laufmittelgemisch Hexan/2-BuOH (200:1) in die jeweiligen enantiomeren Produkte (*ee* > 99%, $\alpha = 1.24$, $R_s = 4.95$) aufgetrennt. Die Rohausbeute an leicht gelblichen Kristallen von (+)-**1** und (–)-**1** betrug *ca.* 1.1 g.

Zur Reinigung wurden die leicht gelblichen Produkte über wenig SiO₂ (Hexan/AcOEt 4:1) filtriert, was zu verbesserten optischen Drehwerten führte. Die Umkristallisation in diversen Lösungsmitteln (Hexan, Pentan, Et₂O, Acetonitril/Wasser, EtOH, MeOH, usw.) war nicht möglich, da die Substanz zwar ausölte, aber auch im Kühlschrank nicht wieder kristallin wurde.

Die gereinigten Produkte wurden während 24 h am HV getrocknet. Die Ausbeuten an farblosen Kristallen von (+)-**1** und (–)-**1** waren mit 1.08 g (3.11 mmol) identisch.

Erscheinungsbild: farblose Kristalle.

$[\alpha]_D^{25} = +12.4$ (*c* = 1.15, EtOH)

Smp.: 44 – 46 °C

HPLC (CHIRALCEL[®] OD-H, Hexan/2-BuOH 200:1, 0.66 ml/min): $k' = 1.68$ ($ee > 99\%$).

DC: R_f (Hexan/AcOEt 4:1) = 0.25

GC: $t_R = 14.0$ min.

IR (Film): 3085 w , 3063 w , 3028 w , 2961 s , 2873 m , 2801 m , 2721 w , 1731 s , 1603 w , 1495 m , 1481 m , 1454 m , 1398 m , 1368 m , 1315 w , 1282 s , 1241 s , 1155 s , 1109 m , 1072 m , 1055 m , 1036 m , 985 m , 947 w , 924 w , 845 w , 804 w , 770 w , 738 m , 699 m , 603 w , 584 w , 526 m , 510 s .

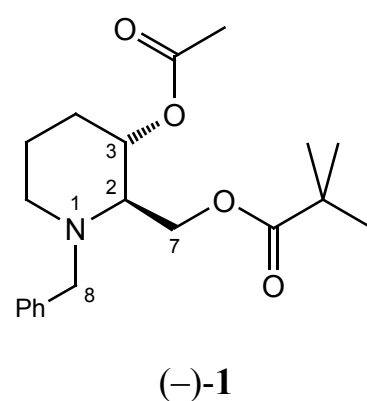
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.31 – 7.21 (m , 5 arom. H); 4.87 (ddd , $^3J(3,4_{ax}) = 8.3$, $^3J(3,2) = 7.6$, $^3J(3,4_{eq}) = 4.4$, H-C(3)); 4.36 (A von ABX , $^2J = 12.2$, $^3J = 3.7$, H_A-C(7)); 4.26 (B von ABX , $^2J = 12.2$, $^3J = 4.1$, H_B-C(7)); 4.04, 3.39 (AB , $^2J = 13.7$, H₂C(8)); 2.74 (m , $w \approx 20$, H_{eq}-C(6)); 2.68 (X von ABX , $^3J(2,3) = 7.6$, $^3J(2, H_B) = 4.1$, $^3J(2, H_A) = 3.7$, H-C(2)); 2.18 – 2.09 (m , H_{ax}-C(6)); 2.07 (s , H₃C (Ac)); 2.07 – 1.98, 1.71 – 1.61 (2 m , H_{eq}-C(4), H_{eq}-C(5)); 1.56 – 1.39 (2 m , H_{ax}-C(4), H_{ax}-C(5)); 1.21 (s , H₃C (^tBu)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 178.3 (C=O (Piv)); 170.2 (C=O (Ac)); 139.5, 128.4, 128.2, 126.7 (6 arom. C); 69.8 (C(3)); 63.4 (C(2)); 60.5 (C(7)); 57.8 (C(8)); 50.1 (C(6)); 38.8 (C (^tBu)); 28.6 (C(4)); 27.1 (3 CH₃ (^tBu)); ; 21.7 (C(5)); 21.2 (CH₃ (Ac)).

MS (EI): 347 (1, M^+); 287 (3, $[M - \text{AcOH}]^+$); 232 (100); 91 (52, PhCH₂⁺).

7.1.2 (-)-*trans*-(2*R*,3*S*)-3-(Acetyloxy)-1-benzyl-piperidin-2-yl-methyl 2,2-Dimethylpropanoat

C₂₀H₂₉NO₄ (347.5)



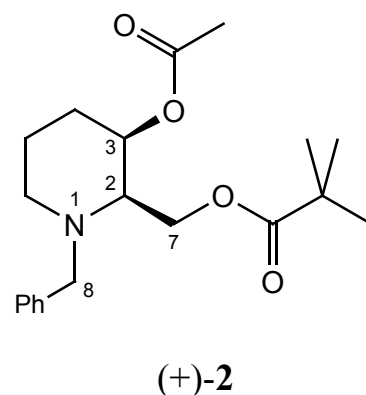
$[\alpha]_D^{25} = -12.2$ ($c = 1.11$, EtOH).

HPLC (CHIRALCEL[®] OD-H, Hexan/2-BuOH 200:1, 0.66 ml/min): $k' = 2.08$ ($ee > 99\%$).

Alle übrigen physikalischen Daten sind mit jenen der enantiomeren Verbindung (+)-**1** in jeder Hinsicht identisch.

7.1.3 (+)-*cis*-(2*R*,3*R*)-3-(Acetyloxy)-1-benzyl-piperidin-2-yl-methyl 2,2-Dimethylpropanoat

C₂₀H₂₉NO₄ (347.5)



Nach [88] wurde das Diastereoisomerengemisch *cis/trans*-1-Benzyl-3-hydroxypiperidin-2-yl 2,2-Dimethylpropanoat (1:1) acetyliert und säulenchromatographisch zu den Epimeren *cis*-(±)-**2** und *trans*-(±)-**1** getrennt.

Das Enantiomerengemisch von *cis*-(±)-**2** wurde mittels präp. HPLC (CHIRALCEL[®] OD) mit dem Laufmittelgemisch Hexan/*i*-PrOH (100:1) in die jeweiligen enantiomeren Produkte (*ee* > 99%, $\alpha = 1.36$) aufgetrennt. Die Rohausbeute an gelblich, öligem (+)-**2** und (–)-**2** betrug jeweils *ca.* 1.6 g.

Zur Reinigung wurden die gelblichen Öle in Hexan gelöst, über Aktivkohle gekocht und über einen Fiberglasfilter filtriert. Dies führte zur Entfärbung der Produkte. Anschliessend wurden die nun farblosen Produkte noch über wenig SiO₂ (Hexan/AcOEt 3:1) filtriert, um Reste von Aktivkohle zu entfernen.

Die gereinigten Produkte wurden während 24 h am HV (Kugelrohr) getrocknet. Die Ausbeute an farblos, öligem (+)-**2** betrug 1.47 g (4.23 mmol) und diejenige von (–)-**2** war mit 1.45 g (4.17 mmol) nur geringfügig kleiner.

Erscheinungsbild: farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{25} = +9.1$ (*c* = 1.10, EtOH)

HPLC (CHIRALCEL[®] OD-H, Hexan/*i*-PrOH 100:1, 0.5 ml/min): *k'* = 0.74 (> 99% *ee*).

DC: R_f (Hexan/AcOEt 4:1) = 0.20

GC: t_R = 14.5 min.

IR (KBr): 3062 w , 3027 w , 2970 s , 2869 m , 2798 m , 2721 w , 1732 s , 1603 w , 1495 m , 1481 m , 1453 m , 1398 m , 1369 s , 1316 w , 1284 s , 1239 s , 1155 s , 1123 m , 1112 m , 1067 m , 1049 m , 1030 m , 982 m , 965 w , 939 w , 911 w , 855 w , 808 w , 769 w , 739 m , 699 m , 651 w , 606 w , 585 w , 543 m , 511 s , 503 s .

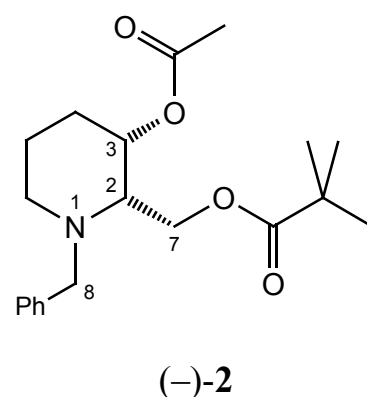
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 7.32 – 7.20 (m , 5 arom. H); 5.09 (dt , $^3J(3,4_{ax}) = 8.3$, $^3J(3,4_{eq}) = ^3J(3,2) = 4.4$, H-C(3)); 4.50 (A von ABX , $^2J = 11.6$, $^3J = 6.4$, H_A -C(7)); 4.22 (B von ABX , $^2J = 11.6$, $^3J = 4.4$, H_B -C(7)); 3.79, 3.68 (AB , $^2J = 14.0$, H_2 C(8)); 3.14 (X von ABX , $^3J(2, H_A) = 6.4$, $^3J(2, H_B) = ^3J(2, 3) = 4.4$, H-C(2)); 2.60 (ddd , $^2J = 12.5$, $^3J = 8.9$, $^3J = 3.1$, H_{eq} – C(6)); 2.38 – 2.29 (m , H_{ax} -C(6)); 2.07 (s , $H_3\text{C}$ (Ac)); 1.75 – 1.45 (m , $H_2\text{C}(4)$, $H_2\text{C}(5)$); 1.20 (s , $H_3\text{C}$ (^tBu)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 178.3 (C=O (Piv)); 170.3 (C=O (Ac)); 139.2, 128.4, 128.2, 126.9 (6 arom. C); 70.5 (C(3)); 60.6 (C(7)); 60.4 (C(2)); 58.9 (C(8)); 47.1 (C(6)); 38.6 (C (^tBu)); 27.1 (3 CH_3 (^tBu)); 26.8 (C(4)); 22.1 (C(5)); 21.2 (CH_3 (Ac)).

MS (EI): 347 (1, M^+); 287 (1, $[M - \text{AcOH}]^+$); 232 (100); 91 (55, PhCH_2^+).

7.1.4 (–)-*cis*-(2*S*,3*S*)-3-(Acetyloxy)-1-benzyl-piperidin-2-yl-methyl 2,2-Dimethylpropanoat

$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ (347.5)



$[\alpha]_D^{25} = -9.0$ ($c = 1.28$, EtOH).

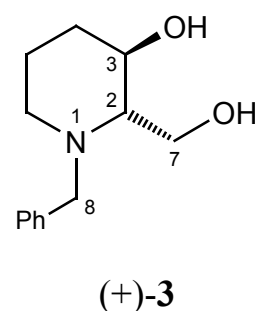
HPLC (CHIRALCEL[®] OD-H, Hexan/*i*-PrOH 100:1, 0.5 ml/min): $k' = 1.01$ (> 99% *ee*).

Alle übrigen physikalischen Daten sind mit jenen der enantiomeren Verbindung (+)-2 in jeder Hinsicht identisch.

7.2 Herstellung der optisch aktiven *cis* -und *trans*-Diole

7.2.1 (+)-*trans*-(2*S*,3*R*)-1-Benzyl-3-hydroxy-piperidin-2-methanol

C₁₃H₁₉NO₂ (221.3)



In einem 50 ml Zweihalsrundkolben wurden 502 mg (1.4 mmol) von (+)-**1** in 15 ml Ethanol gelöst. Anschliessend wurde in Portionen eine Lsg. von 650 mg (11.6 mmol) KOH in 15 ml H₂O zugegeben. Nach 40 min Rühren bei RT wurde das Ethanol am RV entfernt und die wässrige Phase mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten etherischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das LM wurde am RV entfernt und der Rückstand mit AcOEt über wenig SiO₂ filtriert. Nach dem Entfernen des AcOEt am RV und Trocknen am HV erhielt man ein farbloses Öl, das nach wenigen Stunden im Kühlschrank erstarrte. Der Feststoff konnte in Et₂O, durch Diffusion von Hexan, umkristallisiert werden. Man erhielt 256 mg (1.2 mmol, 81%) an (+)-**3** als farblose Kristalle.

Erscheinungsbild: farblose Prismen.

$[\alpha]_D^{25} = +43.5$ (c = 1.05, EtOH)

Smp.: 81 – 84 °C

DC: R_f (AcOEt) = ca. 0.18 (langgezogen)

GC: t_R = 10.4 min.

IR (KBr): 3304_s (br.), 3128_s (br.), 3063_m, 3029_m, 2925_s, 2896_m, 2855_m, 2805_s, 2785_s, 2715_w, 1603_w, 1494_m, 1480_w, 1453_m, 1443_m, 1399_m, 1381_m, 1354_w, 1321_m, 1275_w, 1252_w, 1223_w, 1179_w, 1157_w, 1119_s, 1107_s, 1070_s, 1037_s, 1027_m, 1013_s, 1001_m, 969_w, 932_w, 923_w, 906_w, 875_w, 850_w, 797_w, 738_s, 695_s, 624_w, 576_w, 541_w, 508_w.

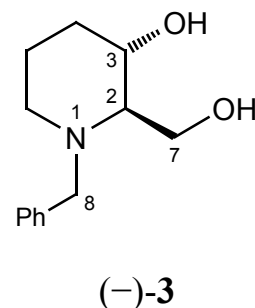
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.34 – 7.22 (*m*, 5 arom. H); 4.04, 3.37 (*AB*, ²*J* = 13.6, H₂C(8)); 4.01 (*A* von *ABX*, ²*J* = 11.3, ³*J* = 3.0, H_A-C(7)); 3.91 (*B* von *ABX*, ²*J* = 11.3, ³*J* = 4.5, H_B-C(7)); 3.76 (*ddd*, ³*J*(3,4_{ax}) = 9.3, ³*J*(3,2) = 7.6, ³*J*(3,4_{eq}) = 4.5, H-C(3)); 2.83 (*br. s*, 2 OH); 2.78 (*dt*, ²*J* = 11.9, ³*J*(6_{eq},5_{ax}) = ³*J*(6_{eq},5_{eq}) = 4.2, H_{eq}-C(6)); 2.29 (*X* von *ABX*, ³*J*(2,3) = 7.6, ³*J*(2,H_B) = 4.5, ³*J*(2,H_A) = 3.0, H-C(2)); 2.13 (*ddd*, ²*J* = 11.9, ³*J*(6_{ax},5_{ax}) = 10.5, ³*J*(6_{ax},5_{eq}) = 3.0, H_{ax}-C(6)); 1.95 (*m*, *dq*-ähnl., ²*J* = 11.5, ³*J*(4_{eq},3) = 4.5, ³*J*(4_{eq},5_{ax}) ≈ ³*J*(4_{eq},5_{eq}) = 4.2, H_{eq}-C(4)); 1.65 (*m*, *dquint.*-ähnl., ²*J* = 11.5, ³*J*(5_{eq},6_{eq}) ≈ ³*J*(5_{eq},4_{eq}) = 4.2, ³*J*(5_{eq},6_{ax}) ≈ ³*J*(5_{eq},4_{ax}) = 3.0, H_{eq}-C(5)); 1.43 (*m*, *tt*-ähnl., ²*J* = 11.5, ³*J*(5_{ax},6_{ax}) ≈ ³*J*(5_{ax},4_{ax}) = 10.5, ³*J*(5_{ax},6_{eq}) ≈ ³*J*(5_{ax},4_{eq}) = 4.2, H_{ax}-C(5)); 1.39 (*m*, *tt*-ähnl., ²*J* = 11.5, ³*J*(4_{ax},5_{ax}) = 10.5, ³*J*(4_{ax},3) = 9.3, ³*J*(4_{ax},5_{eq}) = 3.0, H_{ax}-C(4)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 138.8, 128.9, 128.5, 127.2 (6 arom. C); 68.0 (C(3)); 67.9 (C(2)); 59.1 (C(7)); 58.2 (C(8)); 55.0 (C(6)); 32.5 (C(4)); 22.2 (C(5)).

MS (EI): 221 (1, *M*⁺); 190 (45, [*M* – CH₂OH]⁺); 91 (100, PhCH₂⁺); 65 (15).

7.2.2 (–)-*trans*-(2*R*,3*S*)-1-Benzyl-3-hydroxypiperidin-2-methanol

C₁₃H₁₉NO₂ (221.3)



Zur Verseifung wurden 500 mg (1.4 mmol) (–)-**1** eingesetzt. Synthese und Reinigung erfolgten analog zu oben. Die Ausbeute an (–)-**3** als farblose Kristalle war mit 317 mg (1.4 mmol) quantitativ.

$[\alpha]_D^{25} = -43.7$ (*c* = 1.08, EtOH).

Kristallstruktur: siehe *Tabelle 22, Kapitel 10.2.1*, S. 238.

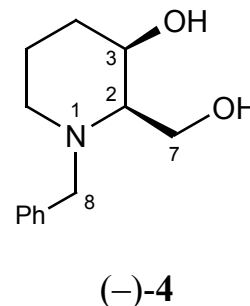
Detaillierte Strukturdaten zur Kristallstruktur und Angaben zum experimentellen

Verfahren sind in der kristallographischen Datenbank des Organisch Chemischen Instituts der Universität Zürich unter dem Kürzel **RU0606** abgelegt.

Alle übrigen physikalischen Daten sind mit jenen der enantiomeren Verbindung (+)-**3** in jeder Hinsicht identisch.

7.2.3 (-)-cis-(2*R*,3*R*)-1-Benzyl-3-hydroxy-piperidin-2-methanol

C₁₃H₁₉NO₂ (221.3)



In einem 50 ml Zweihalsrundkolben wurden 541 mg (1.6 mmol) von (+)-**2** in 10 ml Ethanol gelöst. Anschliessend wurde in Portionen eine Lsg. von 500 mg (8.9 mmol) KOH in 10 ml H₂O langsam zugetropft. Nach 2 h Rühren bei RT wurden weitere 100 mg (1.8 mmol) KOH in 2 ml H₂O zugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde das Ethanol am RV entfernt und die wässrige Phase mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten etherischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das LM wurde am RV entfernt.

Der gelbliche Rückstand wurde zweimal in EtOH über Aktivkohle gekocht und über wenig SiO₂ (AcOEt) filtriert. Nach dem Entfernen des AcOEt am RV und Trocknen am HV erhielt man farblose Kristalle.

Die Kristalle konnten in Et₂O, durch Diffusion von Hexan, umkristallisiert werden. Man erhielt 300 mg (1.4 mmol, 88%) an (-)-**4** als farblose Kristalle.

Erscheinungsbild: farblose Prismen.

$[\alpha]_D^{25} = -21.5$ (c = 0.54, EtOH)

Smp.: 75 – 77 °C

DC: R_f (AcOEt) = ca. 0.18 (langgezogen)

GC: $t_R = 10.3$ min.

IR (KBr): 3383s (*br.*), 3085w (*br.*), 3061m, 3027m, 2936s, 2801s, 1602w, 1585w, 1495m, 1452s, 1367m, 1266w, 1221m, 1223w, 1186w, 1116m, 1065s, 1028s, 989m, 955m, 916w, 885w, 842w, 796w, 737s, 699s, 525s, 504s.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 7.34 – 7.31 (*m*, 3 arom. H); 7.30 – 7.22 (*m*, 2 arom. H); 4.09, 3.52 (*AB*, $^2J = 13.4$, $\text{H}_2\text{C}(8)$); 4.05 (*m*, nicht aufgelöst, $\text{H-C}(3)$); 4.01 (*A* von *ABX*, $^2J = 11.6$, $^3J = 5.6$, $\text{H}_A\text{-C}(7)$); 3.88 (*B* von *ABX*, $^2J = 11.6$, $^3J = 4.0$, $\text{H}_B\text{-C}(7)$); 2.75 (*dt*, $^2J = 11.7$, $^3J(6_{\text{eq}}, 5_{\text{ax}}) = ^3J(6_{\text{eq}}, 5_{\text{eq}}) = 4.7$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(6)$); 2.74 (*br. s*, 2 OH); 2.49 (*X* von *ABX*, $^3J(2, \text{H}_A) = 5.6$, $^3J(2, \text{H}_B) = 4.0$, $^3J(2, 3) = 2.5$, $\text{H-C}(2)$); 2.10 (*ddd*, $^2J = 11.7$, $^3J(6_{\text{ax}}, 5_{\text{ax}}) = 9.7$, $^3J(6_{\text{ax}}, 5_{\text{eq}}) = 3.3$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(6)$); 1.84 – 1.65 (*m*, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(4)$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5)$); 1.59 – 1.44 (*m*, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(4)$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5)$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 139.0, 128.7, 128.3, 127.0 (6 arom. C); 69.2 ($\text{C}(3)$); 64.9 ($\text{C}(2)$); 61.8 ($\text{C}(7)$); 57.8 ($\text{C}(8)$); 50.8 ($\text{C}(6)$); 30.9 ($\text{C}(4)$); 20.4 ($\text{C}(5)$).

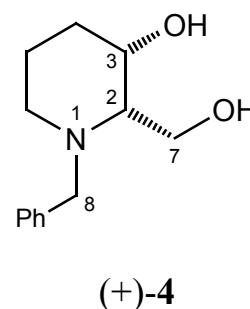
MS (EI): 221 (1, M^+); 190 (100, $[M - \text{CH}_2\text{OH}]^+$); 91 (91, PhCH_2^+); 65 (15).

Kristallstruktur: siehe *Tabelle 22, Kapitel 10.2.1*, S. 238.

Detaillierte Strukturdaten zur Kristallstruktur und Angaben zum experimentellen Verfahren sind in der kristallographischen Datenbank des Organisch Chemischen Instituts der Universität Zürich unter dem Kürzel **RU0603** abgelegt.

7.2.4 (+)-*cis*-(2*S*,3*S*)-1-Benzyl-3-hydroxy-piperidin-2-methanol

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ (221.3)



Zur Verseifung wurden 630 mg (1.8 mmol) (–)-2 eingesetzt. Synthese und Reinigung erfolgten analog zur Vorschrift der enantiomeren Verbindung. Die Ausbeute an (+)-4 als farblose Kristalle war mit 400 mg (1.8 mmol) quantitativ.

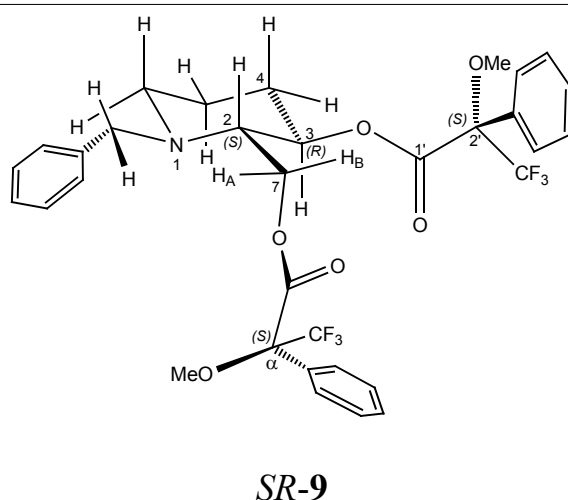
$$[\alpha]_D^{25} = + 21.3 \text{ (c = 1.02, EtOH).}$$

Alle übrigen physikalischen Daten sind mit jenen der enantiomeren Verbindung (–)-**4** in jeder Hinsicht identisch.

7.3 Synthese von MOSHER-Derivaten zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der Dirole

7.3.1 (*S*)-Phenyllessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [*trans*-(2*S*,3*R*)-1-benzyl-3((*S*)-2'-methoxy-1'-oxo-2'-phenylpropoxy-2'-trifluoromethyl)piperidin] Methylester

C₃₃H₃₃F₆NO₆ (653.6)



In einem 10 ml Zweihalsrundkolben mit Septum und Stickstoffaufsatz wurde 17.5 mg (0.08 mmol) (+)-**3** in 3 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ gelöst und mit 46 μ l (0.32 mmol) Triethylamin und einer Spatelspitze DMAP (kat.) versetzt. Anschliessend wurden unter Argon 34 μ l (0.18 mmol) (–)-(*R*)-MTPA-Cl mittels Mikroliterspritze zur Reaktionslösung gegeben. Während der Reaktionszeit verfärbte sich die Reaktionslösung leicht gelblich.

Nach 1 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung direkt über wenig SiO₂ (Et₂O/Hexan 9:1) filtriert, um DMAP und überschüssiges MTPA-Cl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde am RV entfernt und das leicht gelbliche Öl am HV (Kugelrohr) getrocknet.

Die Ausbeute an **SR-9** als gelbliches Öl betrug 47 mg (0.072 mmol, 90%).

Erscheinungsbild: gelbliches Öl.

DC: R_f (AcOEt) = 0.69.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 7.60 – 7.47 (2 *m*, 4 arom. H (MTPA)); 7.40 – 7.31 (*m*, 6 arom. H (MTPA und Benzyl)); 7.26 – 7.18 (*m*, 3 arom. H (MTPA und Benzyl)); 7.16 – 7.12 (*m*, 2 arom. H (MTPA)); 5.05 (*m*, *td*-ähnl., $^3J(3,2) \approx ^3J(3,4_{ax}) = 8.3$,

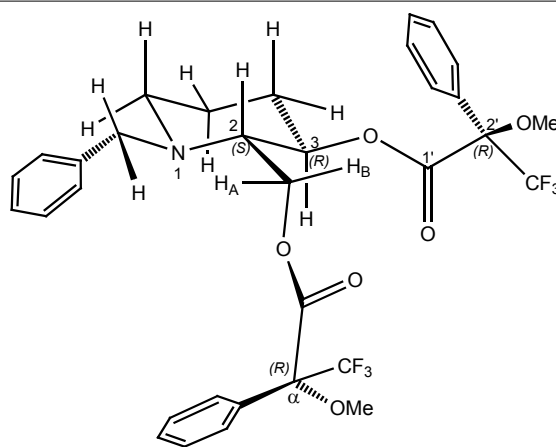
$^3J(3,4_{eq}) = 4.2$, H-C(3)); 4.70 (*A* von *ABX*, $^2J = 12.3$, $^3J = 3.1$, H_A -C(7)); 4.14 (*B* von *ABX*, $^2J = 12.3$, $^3J = 3.0$, H_B -C(7)); 3.98, 3.17 (*AB*, $^2J = 13.4$, $H_2C(8)$); 3.55 (*br. s*, 2 *OMe*); 2.72 (*m*, *q*-ähnl., H_{eq} -C(6)), 2.69 (*X* von *ABX*, H-C(2)); 2.20 (*m_c*, H_{eq} -C(4)); 2.03 (*m*, *t*-ähnl., H_{ax} -C(6)); 1.68 – 1.60 (*m*, H_{eq} -C(5)); 1.56 – 1.41 (*m*, H_{ax} -C(4), H_{ax} -C(5)).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 166.4, 165.4 (C=O (MTPA)); 138.4, 132.5, 132.2 (3 arom. C); 129.7, 128.7, 128.5, 128.3, 127.4, 127.1 (15 arom. C); 123.4 (*q*, $^1J(C,F) = 288.7$, 2 CF_3); 84.8, 84.4 (2 *q*, $^2J(C,F) = 27.8$, C(α), C(2')); 72.3 (C(3)); 63.1 (C(2)); 61.6 (C(7)); 57.9 (C(8)); 55.6, 55.5 (2 *OMe*); 50.1 (C(6)); 28.7 (C(4)); 22.7 (C(5)).

$^{19}F\{^1H\}$ -NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): – 71.52, – 71.58 (2 CF_3).

7.3.2 (R)-Phenyllessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [*trans*-(2*S*,3*R*)-1-benzyl-3((*R*)-2'-methoxy-1'-oxo-2'-phenylpropoxy-2'-trifluoromethyl)piperidin] Methylester

$C_{33}H_{33}F_6NO_6$ (653.6)



SR-10

In einem 10 ml Zweihalsrundkolben mit Septum und Stickstoffaufsatz wurde 17.5 mg (0.08 mmol) (+)-**3** in 3 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 gelöst und mit 46 μ l (0.32 mmol) Triethylamin und einer Spatelspitze DMAP (kat.) versetzt. Anschliessend wurden unter Argon 35 μ l (0.19 mmol) (–)-(*S*)-MTPA-Cl mittels Mikroliterspritze zur Reaktionslösung gegeben. Während der Reaktionszeit verfärbte sich die

Reaktionslösung leicht gelblich.

Nach 1 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung direkt über wenig SiO₂ (Et₂O/Hexan 9:1) filtriert, um DMAP und überschüssiges MTPA-Cl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde am RV entfernt und das leicht gelbliche Öl am HV (Kugelrohr) getrocknet.

Die Ausbeute an **SR-10** als gelbliches Öl betrug 48 mg (0.073 mmol, 92%).

Erscheinungsbild: gelbliches Öl.

DC: R_f (AcOEt) = 0.69.

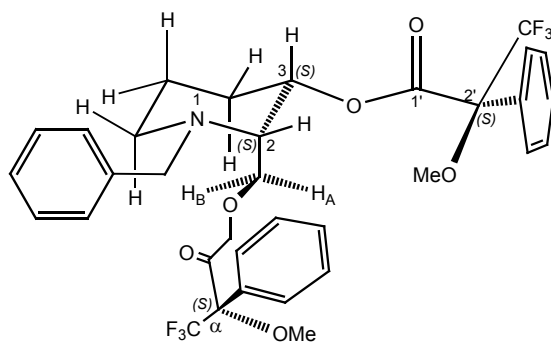
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 7.56 – 7.50 (*m*, 4 arom. H (MTPA)); 7.42 – 7.33 (*m*, 6 arom. H (MTPA und Benzyl)); 7.26 – 7.12 (*m*, 5 arom. H (MTPA und Benzyl)); 5.05 (*ddd*, $^3J(3,4_{ax}) = 7.6$, $^3J(3,2) = 6.8$, $^3J(3,4_{eq}) = 4.1$, H-C(3)); 4.65 (*A* von *ABX*, $^2J = 12.2$, $^3J = 4.3$, H_A-C(7)); 4.46 (*B* von *ABX*, $^2J = 12.2$, $^3J = 3.8$, H_B-C(7)); 3.89, 3.32 (*AB*, $^2J = 13.2$, H₂C(8)); 3.54, 3.51 (2 *m*, *q*-ähnl., $^5J(\text{Me}, \text{F}) = 1.1$, OMe); 2.85 (*X* von *ABX*, $^3J(2,3) = 6.8$, $^3J(2, \text{H}_A) = 4.3$, $^3J(2, \text{H}_B) = 3.8$, H-C(2)); 2.63 (*ddd*, $^2J = 10.5$, $^3J(6_{eq}, 5_{eq}) = 6.6$, $^3J(6_{eq}, 5_{ax}) = 3.5$, H_{eq}-C(6)); 2.13 (*ddd*, $^2J = 11.8$, $^3J(6_{ax}, 5_{ax}) = 8.2$, $^3J(6_{ax}, 5_{eq}) = 3.3$, H_{ax}-C(6)); 2.05 (*ddt*, $^2J = 11.3$, $^3J(4_{eq}, 5_{eq}) = 8.0$, $^3J(4_{eq}, 5_{ax}) \approx ^3J(4_{eq}, 3) = 4.1$, H_{eq}-C(4)); 1.60 (*m_c*, H_{eq}-C(5)); 1.51 (*m_c*, H_{ax}-C(4)); 1.41 (*m_c*, H_{ax}-C(5)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 166.6, 165.7 (C=O (MTPA)); 138.5, 132.1, 132.0 (3 arom. C); 129.7, 129.6, 128.5, 128.2, 127.4, 127.3, 127.0 (15 arom. C); 123.3, 123.4 (*q*, $^1J(\text{C}, \text{F}) = 288.7$, 2 CF₃); 84.8, 84.7 (2 *q*, $^2J(\text{C}, \text{F}) = 27.8$, C(α), C(2')); 72.3 (C(3)); 62.1 (C(2)); 61.6 (C(7)); 57.9 (C(8)); 55.5, 55.3 (2 OMe); 48.8 (C(6)); 27.4 (C(4)); 20.9 (C(5)).

¹⁹F{¹H}-NMR (376.5 MHz, CDCl₃): – 70.46, – 71.65 (2 CF₃).

7.3.3 (S)-Phenyllessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [*cis*-(2*S*,3*S*)-1-benzyl-3((*S*)-2'-methoxy-1'-oxo-2'-phenylpropoxy-2'-trifluoromethyl)piperidin] Methylester

C₃₃H₃₃F₆NO₆ (653.6)



SS-11

In einem 10 ml Zweihalsrundkolben mit Septum und Stickstoffaufsatz wurde 17.5 mg (0.08 mmol) (+)-**4** in 3 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ gelöst und mit 46 μ l (0.32 mmol) Triethylamin und einer Spatelspitze DMAP (kat.) versetzt. Anschliessend wurden unter Argon 35 μ l (0.19 mmol) (–)-(R)-MTPA-Cl mittels Mikroliterspritze zur Reaktionslösung gegeben. Während der Reaktionszeit verfärbte sich die Reaktionslösung leicht gelblich.

Nach 1 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung direkt über wenig SiO₂ (Et₂O/Hexan 9:1) filtriert, um DMAP und überschüssiges MTPA-Cl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde am RV entfernt und das leicht gelbliche Öl am HV (Kugelrohr) getrocknet.

Die Ausbeute an **SS-11** als gelbliches Öl betrug 50 mg (0.076 mmol, 95%).

Erscheinungsbild: gelbliches Öl.

DC: R_f (AcOEt) = 0.70.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 7.54 – 7.47 (2 *m*, 4 arom. H (MTPA)); 7.41 – 7.34 (*m*, 6 arom. H (MTPA und Benzyl)); 7.28 – 7.15 (*m*, 5 arom. H (MTPA und Benzyl)); 5.23 (*dt*, ³*J*(3,4_{ax}) = 7.6, ³*J*(3,4_{eq}) \approx ³*J*(3,2) = 4.0, H-C(3)); 4.66 (*A* von *ABX*, ²*J* = 11.7, ³*J* = 6.5, H_A-C(7)); 4.23 (*B* von *ABX*, ²*J* = 11.7, ³*J* = 4.6, H_B-C(7)); 3.58, 3.43 (*AB*, ²*J* = 14.1, H₂C(8)); 3.50, 3.49 (2 *m*, *q*-ähnl., ⁵*J*(Me,F) = 0.9, 2 OMe); 3.21 (*X* von *ABX*, ³*J*(2,H_A) = 6.5, ³*J*(2,H_B) = 4.6, ³*J*(2,3) = 4.0, H-C(2)); 2.56 (*ddd*, ²*J* = 11.9, ³*J*(6_{eq},5_{eq}) = 7.6, ³*J*(6_{eq},5_{ax}) = 3.3, H_{eq}-C(6)) ; 2.32 (*ddd*, ²*J* = 11.9, ³*J*(6_{ax},5_{ax}) =

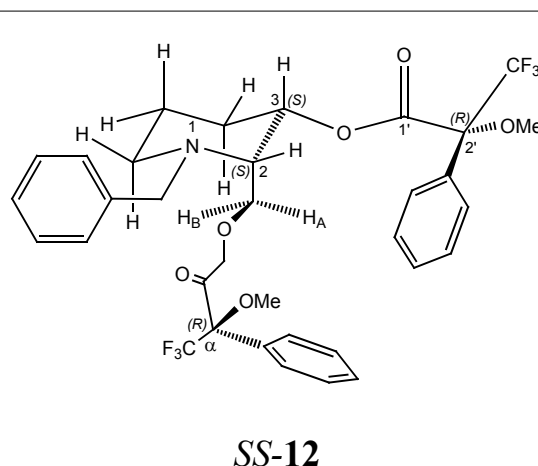
6.6, $^3J(6_{ax},5_{eq}) = 3.8$, H_{ax} -C(6)); 1.71 (m_c , H_2 -C(4)); 1.52 (m_c , H_2 -C(5)).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 166.4, 165.8 (C=O (MTPA)); 139.1, 132.1, 132.0 (3 arom. C); 129.7, 128.5, 128.2, 128.1, 127.4, 127.2, 126.9 (15 arom. C); 123.4, 123.3 (q , $^1J(C,F) = 288.7$, 2 CF_3); 84.7, 84.6 (2 q , $^2J(C,F) = 27.8$, C(α), C(2')); 72.8 (C(3)); 63.0 (C(2)); 60.8 (C(7)); 57.9 (C(8)); 55.5, 55.3 (2 OMe); 47.8 (C(6)); 26.8 (C(4)); 21.0 (C(5)).

$^{19}F\{^1H\}$ -NMR (376 MHz, $CDCl_3$): - 71.48, - 71.60 (2 CF_3).

7.3.4 (R)-Phenyllessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [cis-(2R,3R)-1-benzyl-3((R)-2'-methoxy-1'-oxo-2'-phenylpropoxy-2'-trifluoromethyl)piperidin] Methylester

$C_{33}H_{33}F_6NO_6$ (653.6)



In einem 10 ml Zweihalsrundkolben mit Septum und Stickstoffaufsatz wurde 17.5 mg (0.08 mmol) (+)-**4** in 3 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 gelöst und mit 46 μ l (0.32 mmol) Triethylamin und einer Spatelspitze DMAP (kat.) versetzt. Anschliessend wurden unter Argon 35 μ l (0.19 mmol) (-)-(*S*)-MTPA-Cl mittels Mikroliterspritze zur Reaktionslösung gegeben. Während der Reaktionszeit verfärbte sich die Reaktionslösung leicht gelblich.

Nach 1 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung direkt über wenig SiO_2 (Et_2O /Hexan 9:1) filtriert, um DMAP und überschüssiges MTPA-Cl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde am RV entfernt und das leicht gelbliche Öl am HV (Kugelrohr) getrocknet.

Die Ausbeute an **SS-12** als gelbliches Öl betrug 51 mg (0.076 mmol, 98%).

Erscheinungsbild: gelbliches Öl.

DC: R_f (AcOEt) = 0.70.

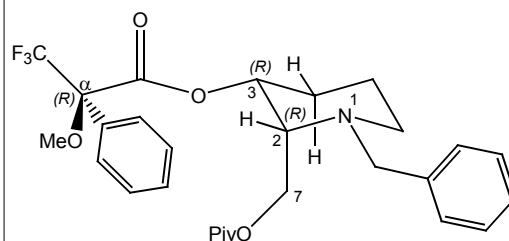
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 7.55 – 7.48 (2 *m*, 4 arom. H (MTPA)); 7.41 – 7.36 (*m*, 6 arom. H (MTPA und Benzyl)); 7.28 – 7.18 (*m*, 5 arom. H (MTPA und Benzyl)); 5.30 (*dt*, $^3J(3,4_{\text{ax}}) = 7.8$, $^3J(3,4_{\text{eq}}) \approx ^3J(3,2) = 4.0$, H-C(3)); 4.49 (*A* von *ABX*, $^2J = 11.8$, $^3J = 6.4$, $\text{H}_A\text{-C}(7)$); 4.22 (*B* von *ABX*, $^2J = 11.8$, $^3J = 4.2$, $\text{H}_B\text{-C}(7)$); 3.65, 3.42 (*AB*, $^2J = 14.0$, $\text{H}_2\text{C}(8)$); 3.54, 3.48 (2 *m*, *q*-ähnl., $^5J(\text{Me},\text{F}) = 1.1$, 2 OMe); 3.17 (*X* von *ABX*, $^3J(2,\text{H}_A) = 6.4$, $^3J(2,\text{H}_B) = 4.2$, $^3J(2,3) = 4.0$, H-C(2)); 2.56 (*ddd*, $^2J = 11.5$, $^3J(6_{\text{eq}},5_{\text{eq}}) = 7.7$, $^3J(6_{\text{eq}},5_{\text{ax}}) = 3.6$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(6)$); 2.31 (*ddd*, $^2J = 11.5$, $^3J(6_{\text{ax}},5_{\text{ax}}) = 7.1$, $^3J(6_{\text{ax}},5_{\text{eq}}) = 4.0$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(6)$); 1.80 (*m_c*, $\text{H}_2\text{-C}(4)$); 1.58 (*m_c*, $\text{H}_2\text{-C}(5)$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 166.3, 165.7 (C=O (MTPA)); 139.0, 132.3, 132.0 (3 arom. C); 129.7, 128.5, 128.2, 128.1, 127.3, 127.2, 127.0 (15 arom. C); 123.4, 123.3 (*q*, $^1J(\text{C},\text{F}) = 288.7$, 2 CF_3); 84.6, 84.5 (2 *q*, $^2J(\text{C},\text{F}) = 27.8$, C(α), C(2')); 72.8 (C(3)); 63.2 (C(2)); 60.7 (C(7)); 57.9 (C(8)); 55.4 (2 OMe); 47.5 (C(6)); 27.1 (C(4)); 21.1 (C(5)).

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3): – 71.45, – 71.46 (2 CF_3).

7.3.5 (R)-Phenylelessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [*cis*-(2*R*,3*R*)-1-benzyl-2-methylpivaloyl piperidin] Ester

$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{NO}_5$ (521.6)



RR-14

Nach [88] wurde das (\pm)-*cis*-1-Benzyl-3-hydroxypiperidin-2-yl 2,2-Dimethylpropanoat (*cis*-**13**) hergestellt.

In einem 10 ml Zweihalsrundkolben mit Septum und Stickstoffaufsatz wurden 77 mg (0.25 mmol) (\pm)-*cis*-1-Benzyl-3-hydroxypiperidin-2-yl 2,2-Dimethylpropanoat in

5 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 gelöst und mit 44 μl (0.31 mmol) Triethylamin und einer Spatelspitze DMAP (kat.) versetzt. Anschliessend wurden 55 μl (0.30 mmol) (–)-(S)-MTPA-Cl mittels Mikroliterspritze zur Reaktionslösung gegeben. Während der Reaktionszeit verfärbte sich die Reaktionslösung leicht gelblich.

Nach 2 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung direkt über wenig SiO_2 (Et_2O /Hexan 9:1) filtriert, um DMAP und überschüssiges MTPA-Cl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde am RV entfernt und das leicht gelbliche Öl am HV (Kugelrohr) getrocknet.

Die Ausbeute an Diastereoisomerengemisch *RR*-14/*SS*-14 als gelbliches Öl betrug 120 mg (0.23 mmol, 92%).

Die diastereoisomeren Produkte *RR*-14 und *SS*-14 wurden anschliessend mittels präp. HPLC (CHIRALCEL[®] OD) mit dem Laufmittelgemisch Hexan/*i*-PrOH (150:1) angereichert ($\alpha = 1.16$, $R_s = 1.16$).

Erscheinungsbild: gelbliches Öl.

HPLC (CHIRALCEL[®] OD-H, Hexan/*i*-PrOH 150:1): $k' = 1.19$ ($de = 90\%$).

DC: R_f (AcOEt) = 0.67.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): 7.51 – 7.46 (*m*, 2 arom. H); 7.35 – 7.31 (*m*, 3 arom. H); 7.24 – 7.13 (*m*, 5 arom. H); 5.26 (*dt*, $^3J(3,4_{\text{ax}}) = 6.6$, $^3J(3,4_{\text{eq}}) \approx ^3J(3,2) = 3.3$, H-C(3)); 4.39 (*A* von *ABX*, $^2J = 11.5$, $^3J = 6.3$, H_A -C(7)); 3.92 (*B* von *ABX*, $^2J = 11.5$, $^3J = 5.6$, H_B -C(7)); 3.73, 3.39 (*AB*, $^2J = 14.1$, $\text{H}_2\text{C}(8)$); 3.48 (*m*, *q*-äbnl., $^5J(\text{Me}, \text{F}) = 1.0$, OMe); 2.98 (*X* von *ABX*, $^3J(2, \text{H}_A) = 6.3$, $^3J(2, \text{H}_B) = 5.6$, $^3J(2,3) = 3.2$, H-C(2)); 2.59 (*ddd*, $^2J = 11.7$, $^3J(6_{\text{eq}}, 5_{\text{eq}}) = 6.2$, $^3J(6_{\text{eq}}, 5_{\text{ax}}) = 3.8$, H_{eq} -C(6)); 2.16 (*ddd*, $^2J = 11.7$, $^3J(6_{\text{ax}}, 5_{\text{ax}}) = 8.4$, $^3J(6_{\text{ax}}, 5_{\text{eq}}) = 3.5$, H_{ax} -C(6)); 1.83 – 1.73 (*m*, H-C(4)); 1.67-1.57 (*m*, H-C(4)); 1.57 – 1.45 (*m*, H-C(5)) 1.42 – 1.32 (*m*, H-C(5)); 1.12 (*s*, 3 CH_3).

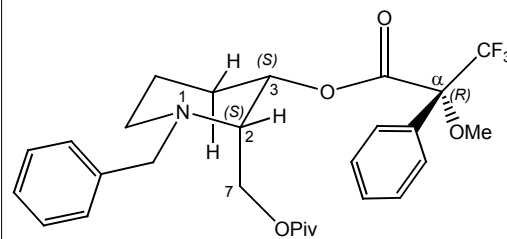
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3): 178.0 (C=O (Piv)), 165.9 (C=O (MTPA)); 139.3, 132.0 (2 arom. C); 129.5, 128.4, 128.2, 128.1, 127.3, 126.8 (10 arom. C); 123.3 (*q*, $^1J(\text{C}, \text{F}) = 287.8$, CF_3); 84.6 (*q*, $^2J(\text{C}, \text{F}) = 27.6$, C(α)); 72.5 (C(3)); 61.8 (C(2)); 61.1 (C(7)); 58.0 (C(8)); 55.3 (*q*, OMe); 49.2 (C(6)); 38.6 (C (Piv)); 27.3 (C(4)); 27.1

(3 CH₃ (Piv)); 20.7 (C(5)).

¹⁹F{¹H}-NMR (376.5 MHz, CDCl₃): – 71.65, (CF₃).

7.3.6 (R)-Phenyllessigsäure- α -methoxy- α -trifluoromethyl [cis-(2S,3S)-1-benzyl-2-methylpivaloyl piperidin] Ester

C₂₈H₃₄F₃NO₅ (521.6)



SS-14

Erscheinungsbild: gelbliches Öl.

HPLC (CHIRALCEL[®] OD-H, Hexan/*i*-PrOH 150:1): *k'* = 1.38 (*de* = 83%).

DC: *R_f* (AcOEt) = 0.67.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.52 – 7.47 (*m*, 2 arom. H); 7.36 – 7.30 (*m*, 3 arom. H); 7.25 – 7.13 (*m*, 5 arom. H); 5.28 (*dt*, ³*J*(3,4_{ax}) = 6.9, ³*J*(3,4_{eq}) ≈ ³*J*(3,2) = 3.3, H-C(3)); 4.34 (*A* von *ABX*, ²*J* = 11.6, ³*J* = 6.4, H_A-C(7)); 3.78 (*B* von *ABX*, ²*J* = 11.6, ³*J* = 5.2, H_B-C(7)); 3.72, 3.39 (*AB*, ²*J* = 14.1, H₂C(8)); 3.51 (*m*, *q*-ähnl., ⁵*J*(Me,F) = 1.0, OMe); 2.97 (*X* von *ABX*, ³*J*(2,H_A) = 6.4, ³*J*(2,H_B) = 5.2, ³*J*(2,3) = 3.3, H-C(2)); 2.60 (*ddd*, ²*J* = 11.6, ³*J*(6_{eq},5_{eq}) = 6.4, ³*J*(6_{eq},5_{ax}) = 3.4, H_{eq}-C(6)); 2.18 (*ddd*, ²*J* = 11.6, ³*J*(6_{ax},5_{ax}) = 7.9, ³*J*(6_{ax},5_{eq}) = 3.4, H_{ax}-C(6)); 1.88 – 1.78 (*m*, H-C(4)); 1.73 – 1.56 (*m*, H-C(4), H-C(5)); 1.49 – 1.39 (*m*, H-C(5)); 1.12 (*s*, 3 CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 178.1 (C=O (Piv)), 165.9 (C=O (MTPA)); 139.4, 132.2 (2 arom. C); 129.6, 128.4, 128.2, 128.1, 127.3, 126.9 (10 arom. C); 123.4 (*q*, ¹*J*(C,F) = 287.8, CF₃); 84.1 (*q*, ²*J*(C,F) = 27.8, C(α)); 72.6 (C(3)); 61.5 (C(2)); 61.3 (C(7)); 58.2 (C(8)); 55.4 (OMe); 48.9 (C(6)); 38.6 (C(Piv)); 27.5 (C(4)); 27.1 (3 CH₃ (Piv)); 21.2 (C(5)).

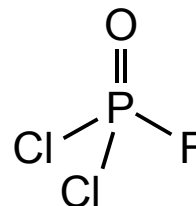
¹⁹F{¹H}-NMR (376.5 MHz, CDCl₃): – 71.64, (CF₃).

7.4 Synthese der *N*-benzylierten optisch aktiven Acetylcholinmimetika

7.4.1 Dichlorfluorophosphat

Cl_2FOP (136.88)

$d_4^{20} = 1.568$



Nach [105]⁵² wurde unter Stickstoffatmosphäre in einem ausgeheizten 500 ml Dreihalsrundkolben mit Rückflusskühler und Tropftrichter (detaillierte Apparatur siehe **Abbildung 57**, **Kapitel 10.1**, S. 235) 48 g (1.30 mol) zerriebenes NH_4F vorgelegt. Um das Sublimieren des NH_4F bei der exothermen Reaktion zu verhindern, wurde der Reaktionskolben vor dem Zutropfen von 62.5 ml (104.7 g, 0.68 mol) POCl_3 mittels Eis/ NaCl Bad auf $< 0^\circ\text{C}$ gekühlt.

Die ganze Apparatur wurde mit Teflonschläuchen und Teflonmanschetten versehen und alle Verbindungsstücke zusätzlich mit Teflonband abgedichtet. Es wurde auf Gummidichtungen verzichtet, da diese gegen die fluorhaltigen Verbindungen nicht stabil sind und sich auflösen.

Das POCl_3 wurde innerhalb einer Stunde zum NH_4F getropft. Danach wurde das Reaktionsgemisch langsam auf 115°C aufgeheizt⁵³ und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Dabei kondensierte man die entstandenen Phosphorylfluoride (POF_xCl_y) in einer Kühlfalle, welche mit einem Aceton/Trockeneis Gemisch auf -78°C gekühlt wurde.

Der Reaktionskolben wurde dann von der Kühlfalle abgetrennt, indem der Teflonschlauch mit einer Klemme abgeklemmt und anschliessend abgeschnitten wurde. Das Gemisch in der Kühlfalle wurde dann während 24h langsam auf RT

⁵² Eine alternative Synthese von POFCl_2 ist in [138] beschrieben. Die angegebene Ausbeute beträgt 47%. Das in [138] verwendete $\text{K}_2\text{PO}_3\text{F}$ wurde nach [139] hergestellt.

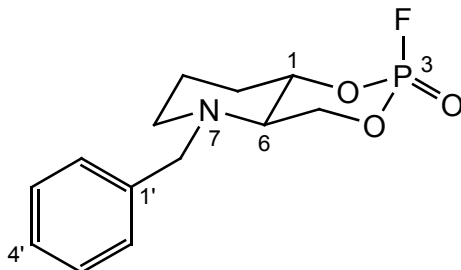
⁵³ Dabei entstand ein starker, weisser Nebel im Reaktionskolben, der sich bis in den Rückflusskühler ausbreitete. Dieser Nebel bestand wohl zur Mehrheit aus HCl(g) und evt. wenig POF_xCl_y .

aufgewärmt, wobei POF_3 und mehrheitlich auch POF_2Cl über eine *ca.* 60 cm lange Vigreux-Kolonne und Waschflaschen (0.1M NaOH) abdestilliert wurden⁵⁴.

Die Rohausbeute betrug 10.8g (*ca.* 0.08 mol, 12%) POFCl_2 , verunreinigt mit wenig POF_xCl_y . Dieses Gemisch wurde anschliessend bei 54 – 100°C fraktioniert destilliert⁵⁵. Das Produkt wurde als farblose Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 6.6 g (4.2 ml, 0.05 mmol, 7.4%) erhalten.

³¹P-NMR (121.4 MHz, CDCl_3): 2.06 (*d*, $^1J(\text{P},\text{F}) = 1192$).

¹⁹F-NMR (282.2 MHz, CDCl_3): – 7.99 (*d*, $^1J(\text{F},\text{P}) = 1192$).

<p>7.4.2 (–)-<i>trans</i>-(1<i>S</i>,3<i>S</i>,6<i>R</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7-benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid</p> <p>$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{FNO}_3\text{P}$ (285.24)</p>	 <p style="text-align: center;">(–)-5ax</p>
--	---

In einem ausgeheizten 10 ml Zweihalsrundkolben mit Stickstoffaufsatz und Septum wurden 97 mg (0.44 mmol) (–)-**3** in 3 ml abs. Et_2O gelöst und mit 155 μl (1.1 mmol) abs. Et_3N versetzt. Man kühlte die Lösung für *ca.* 20 min mittels NaCl/Eisbad auf $< 0^\circ\text{C}$. In einem separaten 10 ml Einhalsspitzkolben mit Septum wurden aus der *glove box* unter N_2 -Atmosphäre, 49 μl (76.8 mg, 0.56 mmol, *ca.* 1.2 äq.) POCl_2F in 1 ml abs. Et_2O gelöst und ausgeschleust. Die POCl_2F -Lsg. wurde ebenfalls mittels Eisbad gekühlt.

Nach *ca.* 10 Minuten Kühlen wurde die POCl_2F -Lsg. mit einer Spritze mit langer, gebogener Nadel (verhindert Tropfen) in den Zweihalsrundkolben übergeführt. Unmittelbar nach der Zugabe bildete sich das Ammoniumsalz des Triethylamins als

⁵⁴ Die Apparatur wurde anschliessend mit 0.1M NaOH Lösung gewaschen. Es wurde zwingend darauf verzichtet, Alkohole zur Reinigung der Apparatur einzusetzen, da dabei stark toxische Produkte entstehen können (siehe DFP!).

⁵⁵ Vorsicht! Die fluorierten Phosphorylverbindungen bilden ein azeotropes Gemisch. Sdp.(POF_3): – 40°C, Sdp.(POF_2Cl): 2.9°C, Sdp.(POFCl_2): 52.5°C.

weisser Niederschlag. Die Reaktion wurde nach ein bis zwei Minuten abgebrochen. Dazu wurde die Reaktionslösung mit einer Spritze mit gebogener Nadel entnommen und über wenig Silicagel filtriert.

Zur Verbesserung der Ausbeute wurde das restliche Ammoniumsalz im Reaktionskolben mit 5 ml Et₂O versetzt und während 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Die resultierende Lösung filtrierte man jeweils auch über wenig Silicagel. Das Lösungsmittel wurde zur Schonung der Verbindungen mit N₂ abgeblasen.

Mittels DC überprüfte man die Reaktion auf ihre Vollständigkeit. Mittels ¹H-NMR und ³¹P-NMR konnte ein Diastereoisomerenverhältnis von 1.6:1 zugunsten des axialen Epimers festgestellt werden.

Die Trennung der Diastereoisomeren konnte säulenchromatographisch (3 g SiO₂, Et₂O/Hexan 2:1) durchgeführt werden. Dabei war darauf zu achten, dass die Substanzen nicht länger als 10 Minuten auf der Säule blieben, da sonst die Ausbeuten von (–)-**5eq** gegen Null gingen. (–)-**5eq** scheint auf der Säule zu (–)-**5ax** zu epimerisieren.

So erhielt man 70 mg (0.25 mmol, 57%) von (–)-**5ax** und 21 mg (0.07 mmol, 16%) von (–)-**5eq** als farblose Kristalle.

Erscheinungsbild: Farblose Prismen.

Smp.: 82.3 – 83.8 °C.

DC: R_f (Et₂O/Hexan 2:1) = 0.26.

GC: t_R = 14.9 min

$[\alpha]_D^{25} = -72.8$ (c = 0.29, Aceton-d₆).

IR (KBr): 3027_w, 2961_m, 2918_m, 2815_m, 2723_w, 1495_w, 1455_m, 1402_w, 1335_s, 1285_m, 1146_m, 1123_m, 1103_w, 1071_m, 1051_s, 1006_s, 988_m, 955_w, 928_w, 887_s, 848_w, 824_w, 788_m, 756_s, 705_m, 646_w, 593_m, 564_m, 526_m, 516_w.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆): 7.36 – 7.22 (*m*, H-C(2') – H-C(6')); 4.92 (*A* von *ABX-P*, ²*J* = 10.8, ³*J*(5eq,P) = 25.3, ³*J*(5eq,6) = 4.2, H_{eq}-C(5)); 4.44 (*ddd*, ³*J*(1,6) = 10.5, ³*J*(1,10ax) = 9.0, ³*J*(1,10eq) = 4.8, H-C(1)); 4.35 (*B* von *ABX-P*, ²*J* = ³*J*(5ax,6) =

10.8, $^3J(5_{\text{ax}},\text{P}) \approx 1$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5)$); 3.96, 3.37 (*AB*, $^2J = 13.8$, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 2.86 – 2.75 (*m*, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(8)$); 2.72 (*X* von *ABX-P*, $^3J(6,5_{\text{ax}}) = 10.8$, $^3J(6,1) = 10.5$, $^3J(6,5_{\text{eq}}) = 4.2$, $\text{H-C}(6)$); 2.18 – 2.07 (*m*, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(10)$); 2.15 (*td*, $^2J = ^3J(8_{\text{ax}},9_{\text{ax}}) = 12.0$, $^3J(8_{\text{ax}},9_{\text{eq}}) = 3.0$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(8)$); 1.78 – 1.68 (*m*, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(9)$); 1.68 – 1.54 (*m*, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(9)$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(10)$).

^{13}C -NMR (100 MHz, Aceton- d_6): 139.7 ($\text{C}(1')$); 129.4 ($\text{C}(3')$, $\text{C}(5')$); 129.3 ($\text{C}(2')$, $\text{C}(6')$); 128.1 ($\text{C}(4')$); 83.2 (*dd*, $^2J(1,\text{P}) = 7.2$, $^3J(1,\text{F}) \approx 1.8$, $\text{C}(1)$); 73.5 (*d*, $^2J(5,\text{P}) = 8.0$, $\text{C}(5)$); 62.2 (*d*, $^3J(6,\text{P}) = 4.8$, $\text{C}(6)$); 58.3 ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 53.3 ($\text{C}(8)$); 31.9 (*d*, $^3J(10,\text{P}) = 9.5$, $\text{C}(10)$); 23.7 (*d*, $^4J(9,\text{P}) = 2.4$, $\text{C}(9)$).

^{31}P -NMR (161.9 MHz, Aceton- d_6): – 15.0 (*ddd*, $^1J(\text{P},\text{F}) = 1004$, $^3J(\text{P},\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5)) = 25.3$, $^3J(\text{P},\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5)) \approx 1$).

^{19}F -NMR (376.5 MHz, Aceton- d_6): – 86.4 (*d*, $^1J(\text{F},\text{P}) = 1004$).

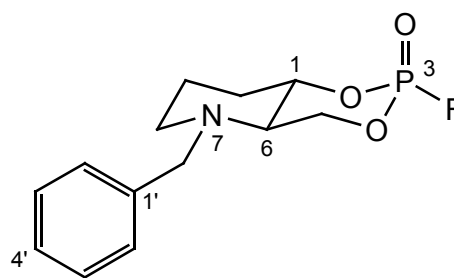
MS (EI): 285 (14, M^+), 194 (9, $[M - \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2]^+$), 186 (14), 171 (19), 160 (23), 91 (100, $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2]^+$), 77 (11, $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$).

Kristallstruktur: siehe *Tabelle 23 Kapitel 10.2.2*, S. 241.

Detaillierte Strukturdaten zur Kristallstruktur und Angaben zum experimentellen Verfahren sind in der kristallographischen Datenbank des Organisch Chemischen Instituts der Universität Zürich unter dem Kürzel **RU0607** abgelegt.

7.4.3 (–)-*trans*-(1*S*,3*R*,6*R*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7-benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{FNO}_3\text{P}$ (285.24)



(–)-5eq

Erscheinungsbild: Farblose Plättchen.

Smp.: 68.4 – 70.7 °C.

DC: R_f ($\text{Et}_2\text{O}/\text{Hexan}$ 2:1) 0.19.

GC: $t_R = 14.9$ min

$[\alpha]_D^{25} = -93.8$ (c = 0.26, Aceton).

IR (KBr): 3062w, 3028w, 2961m, 2859m, 2723w, 1604w, 1494m, 1480m, 1455m, 1439m, 1398m, 1325s, 1292s, 1262m, 1228w, 1126m, 1080s, 1008s, 953m, 924m, 878s, 847m, 806w, 777m, 741s, 699s, 653m, 597m, 566m, 524m.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆): 7.36 – 7.22 (m, H-C(2') – H-C(6')); 4.97 (A von ABX-P, ²J = 10.2, ³J(5eq,P) = 8.5, ³J(5eq,6) = 5.5, H_{eq}-C(5)); 4.55 (sept.-ähnl., ³J(1,10ax) ≈ ³J(1,6) = 9.5, ³J(1,10eq) = 4.5, ⁴J(1,F) = 3.5, ³J(1,P) ≈ 1, H-C(1)); 4.49 (B von ABX-P, ³J(5ax,P) = 14.5, ²J = ³J(5ax,6) = 10.3, ⁴J(5ax,F) = 3.2, H_{ax}-C(5)); 3.86, 3.28 (AB, ²J = 13.6, CH₂C₆H₅); 2.85 (X von ABX, ³J(6,5ax) = 10.3, ³J(6,1) = 9.5, ³J(6,5eq) = 5.5, ⁵J(6,F) = 3.8, H-C(6)); 2.76 (m, d-ähnl., ²J ≈ 12, H_{eq}-C(8)); 2.24 – 2.17 (m, H_{eq}-C(10)); 2.08 (td, ²J = ³J(8ax,9ax) = 11.9, ³J(8ax,9eq) = 2.8, H_{ax}-C(8)); 1.75 – 1.68 (m, H_{eq}-C(9)); 1.63 – 1.50 (m, H_{ax}-C(9), H_{ax}-C(10)).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-d₆): 139.4 (C(1')); 129.6 (C(3'), C(5')); 129.3 (C(2'), C(6')); 128.1 (C(4')); 82.1 (dd, ²J(1,P) = 6.3, ³J(1,F) = 1.5, C(1)); 74.1 (d, ²J(5,P) = 8.4, C(5)); 61.2 (d, ³J(6,P) = 10.6, C(6)); 58.4 (CH₂C₆H₅); 52.8 (C(8)); 32.0 (d, ³J(10,P) = 7.6, C(10)); 23.5 (d, ⁴J(9,P) = 2.3, C(9)).

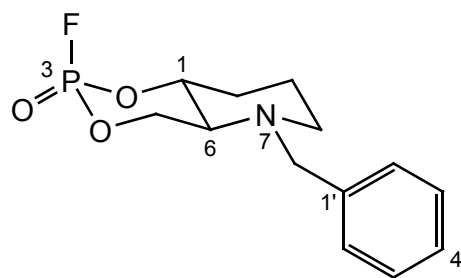
³¹P-NMR (161.9 MHz, Aceton-d₆): – 14.1 (dddd, ¹J(P,F) = 988, ³J(P,H_{ax}-C(5)) = 14.5, ³J(P,H_{eq}-C(5)) = 8.5, ³J(P,H-C(1)) ≈ 1).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, Aceton-d₆): – 71.2 (d, ¹J(F,P) = 988, ⁴J(F,H-C(1)) ≈ ⁴J(F,H_{ax}-C(5)) ≈ ⁵J(F,H-C(6)) ≈ 3.5).

MS (EI): 285 (10, M⁺), 194 (10, [M – C₆H₅CH₂]⁺), 186 (12), 171 (16), 160 (22), 91 (100, [C₆H₅CH₂]⁺), 77 (4, [C₆H₅]⁺).

7.4.4 (+)-*trans*-(1*R*,3*R*,6*S*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7-benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid

C₁₃H₁₇FNO₃P (285.24)



(+)-5ax

Die Synthese von (+)-**5ax** und (+)-**5eq** erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie oben für (–)-**5ax** und (–)-**5eq** beschrieben.

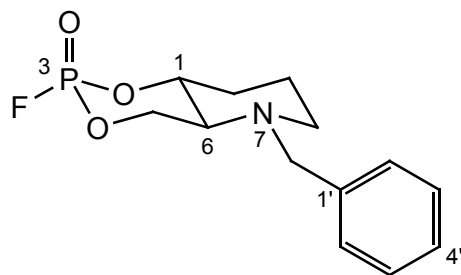
Es wurde mit einem Ansatz von 100 mg (0.45 mmol) (+)-**3** gearbeitet. Man erhielt 62 mg (0.22 mmol, 49%) mg von (+)-**5ax** und 27 mg (0.10 mmol, 22%) von (+)-**5eq** als farblose Kristalle.

$[\alpha]_D^{25} = + 70.7$ ($c = 0.29$, Aceton).

Die übrigen physikalischen Daten sind mit denen der enantiomeren Verbindungen (–)-**5ax** in jeder Hinsicht identisch.

7.4.5 (+)-*trans*-(1*R*,3*S*,6*S*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7-benzyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid

C₁₃H₁₇FNO₃P (285.24)



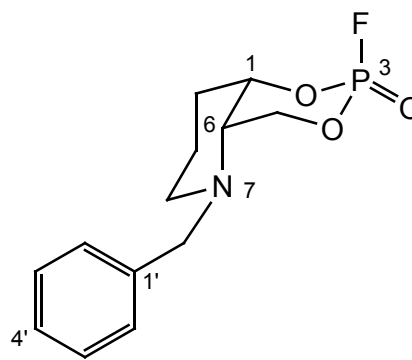
(+)-5eq

$[\alpha]_D^{25} = + 91.9$ ($c = 0.27$, Aceton).

Die übrigen physikalischen Daten sind mit denen der enantiomeren Verbindungen (–)-**5eq** in jeder Hinsicht identisch.

7.4.6 (+)-*cis*-(1*S*,3*R*,6*S*)-3-Fluoro-2,4-dioxo-7-aza-7-benzyl-3-phospha-bicyclo-[4.4.0]decan 3-Oxid

C₁₃H₁₇FNO₃P (285.24)



(+)-6ax

In einem ausgeheizten 10 ml Zweihalsrundkolben mit Stickstoffaufsatz und Septum wurden 101 mg (0.46 mmol) (+)-4 in 3 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit 155 µl (1.1 mmol) abs. Et₃N versetzt. Man kühlte die Lösung für *ca.* 20 min mittels NaCl/Eisbad auf < 0°C. In einem separaten 10 ml Einhalsspitzkolben mit Septum wurden aus der *glove box* unter N₂-Atmosphäre, 49 µl (76.8 mg, 0.56 mmol, *ca.* 1.2 äq.) POCl₂F in 1 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und ausgeschleust. Die POCl₂F-Lsg. wurde ebenfalls mittels Eisbad gekühlt.

Nach *ca.* 10 Minuten Kühlen wurde die POCl₂F-Lsg. mit einer Spritze mit langer, gebogener Nadel (verhindert Tropfen) in den Zweihalsrundkolben überführt. Unmittelbar nach der Zugabe bildete sich das Ammoniumsalz des Triethylamins als weisser Niederschlag. Die Reaktion wurde nach ein bis zwei Minuten abgebrochen. Dazu wurde die Reaktionslösung mit einer Spritze mit gebogener Nadel entnommen und über wenig Silicagel filtriert.

Zur Verbesserung der Ausbeute wurde das restliche Ammoniumsalz im Reaktionskolben mit 5 ml CH₂Cl₂ versetzt und während 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Die resultierende Lösung filtrierte man jeweils auch über Silicagel. Das Lösungsmittel wurde zur Schonung der Verbindungen mit N₂ abgeblasen.

Mittles DC überprüfte man die Reaktion auf ihre Vollständigkeit. Das Diastereoisomerenverhältnis war *ca.* 1:1.

Die Trennung der Diastereoisomeren konnte säulenchromatographisch (3 g SiO₂, AcOEt/Hexan 1:1) durchgeführt werden. Die *cis*-Decaline scheinen nicht so anfällig

auf Epimerisierung wie die *trans*-Decaline. Trotzdem wurde die Trennung innerhalb von 10 Minuten durchgeführt.

So erhielt man 50 mg (0.18 mmol, 39%) von (+)-**6ax** als farblose Kristalle und 59 mg (0.21 mmol, 46%) von (+)-**6eq** als leicht gelbliches Öl.

Erscheinungsbild: farblose Prismen

Smp.: 101.5 – 104.0 °C.

DC: R_f (AcOEt/Hexan 1:1) 0.24.

GC: t_R = 15.0 min.

$[\alpha]_D^{25} = +58.5$ ($c = 0.38$, Aceton).

IR (KBr): 3082 w , 3030 w , 2969 m , 2950 m , 2807 m , 2785 m , 1606 w , 1493 m , 1450 m , 1431 w , 1381 m , 1360 m , 1343 s , 1325 s , 1252 m , 1229 m , 1203 w , 1151 s , 1121 m , 1111 m , 1085 s , 1073 m , 1058 s , 1046 s , 1033 s , 988 s , 968 m , 930 w , 904 s , 884 s , 869 m , 848 w , 827 s , 760 s , 730 s , 700 m , 649 m , 538 w , 524 m .

¹H-NMR (400 MHz, Aceton- d_6): 7.43 – 7.22 (m , H-C(2') – H-C(6')); 5.05 (A von ABX - P , $^2J = 13.0$, $^3J(5_{eq},P) = 25.7$, $^3J(5_{eq},6) = 1.6$, H $_{eq}$ -C(5)); 5.00 (m , $w_{1/2} \approx 8$, H-C(1)); 4.54 (B von ABX - P , $^2J = 13.0$, $^3J(5_{ax},6) = ^3J(5_{ax},P) = 1.5$, H $_{ax}$ -C(5)); 4.25, 3.27 (AB , $^2J = 13.8$, $CH_2C_6H_5$); 2.87 (m , d_{quint} -ähnl., $^2J = 11.6$, H $_{eq}$ -C(8)); 2.67 (X von ABX - P , $^3J(6,1) = ^3J(6,5_{ax}) = ^3J(6,5_{eq}) = ^4J(6,P) = 1.6$, H-C(6)); 2.15 (td , $^2J = ^3J(8_{ax},9_{ax}) = 12.2$, $^3J(8_{ax},9_{eq}) = 2.7$, H $_{ax}$ -C(8)); 2.02 (m , $br. d$ -ähnl., H $_{eq}$ -C(10)); 1.84 (qt , $^2J \approx ^3J(9_{ax},8_{ax}) \approx ^3J(9_{ax},10_{ax}) \approx 12.2$, $^3J(9_{ax},8_{eq}) = ^3J(9_{ax},10_{eq}) = 3.8$, H $_{ax}$ -C(9)); 1.74 (m_c , $^4J(10_{ax},P) = 7.1$, H $_{ax}$ -C(10)); 1.47 (m , dq -ähnl., $^2J \approx 12.2$, H $_{eq}$ -C(9)).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton- d_6): 139.8 (C(1')); 129.7 (C(3'), C(5')); 129.2 (C(2'), C(6')); 127.9 (C(4')); 81.5 (d , $^2J(1,P) = 7.7$, C(1)); 70.4 (dd , $^2J(5,P) = 7.3$, $^3J(5,F) < 1$, C(5)); 58.9 (d , $^3J(6,P) = 5.3$, C(6)); 57.5 ($CH_2C_6H_5$); 52.5 (C(8)); 30.7 (d , $^3J(10,P) = 8.8$, C(10)); 20.5 (C(9)).

³¹P-NMR (161.9 MHz, Aceton- d_6): – 15.3 ($dddd$, $^1J(P,F) = 987$, $^3J(P,H_{eq}-C(5)) = 25.7$, $^4J(P,H_{ax}-C(10)) = 7.1$, $^4J(P,6) = 1.6$, $^3J(P,H_{ax}-C(5)) = 1.5$).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, Aceton- d_6): – 83.6 (d , $^1J(F,P) = 987$).

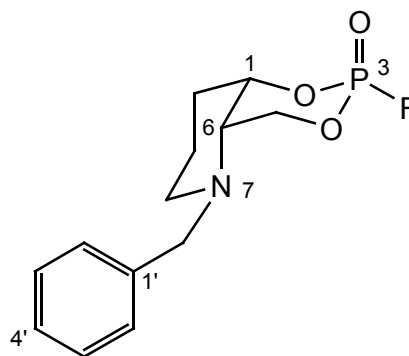
MS (EI): 285 (20, M^+), 194 (15, $[M - C_6H_5CH_2]^+$), 186 (15), 172 (21), 160 (34), 91 (100, $[C_6H_5CH_2]^+$), 65 (11).

Kristallstruktur: siehe *Tabelle 23, Kapitel 10.2.2*, S. 241.

Detaillierte Strukturdaten zur Kristallstruktur und Angaben zum experimentellen Verfahren sind in der kristallographischen Datenbank des Organisch Chemischen Instituts der Universität Zürich unter dem Kürzel **RU0702** abgelegt.

7.4.7 (+)-cis-(1S,3S,6S)-3-Fluoro-2,4-dioxo-7-aza-7-benzyl-3-phospha-bicyclo-[4.4.0]decan 3-Oxid

$C_{13}H_{17}FNO_3P$ (285.24)



(+)-6eq

Erscheinungsbild: farbloses Öl

DC: R_f (Et₂O/Hexan 2:1) = 0.26.

GC: t_R = 15.1 min.

$[\alpha]_D^{25} = +23.3$ (c = 0.26, Aceton).

IR (Film): 3086w, 3063w, 3028w, 2962m, 2948m, 2934w, 1495w, 1486w, 1463w, 1450w, 1385w, 1364w, 1329m, 1299s, 1245w, 1225w, 1200w, 1447m, 1121m, 1106m, 1088s, 1054s, 997s, 910m, 878m, 849m, 838w, 821m, 766w, 722m, 697m, 652w, 600w, 582w, 543w, 532w.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆): 7.39 – 7.22 (m, H-C(2') – H-C(6')); 5.00 (A von ABX-P, $^2J = 11.8$, $^3J(5eq,P) = 10.9$, $^3J(5eq,6) = 7.0$, H_{eq}-C(5)); 4.95 (m_c, $^3J(1,P) = 12.8$, $^3J(1,6) = 3.4$, $^4J(1,F) = 2.7$, H-C(1)); 4.62 (B von ABX-P, $^3J(5ax,P) = 14.0$, $^2J = 11.8$, $^3J(5ax,6) = 3.4$, $^4J(5ax,F) \approx 2.3$, H_{ax}-C(5)); 4.04, 3.59 (AB, $^2J = 13.7$, CH₂C₆H₅); 3.21 (X von ABX-P, $^3J(6,5eq) = 6.8$, $^3J(6,5ax) \approx ^3J(6,1) = 3.4$, $^4J(6,P) = 1.8$, H-C(6)); 2.72 (ddd, $^2J = 12.0$, $^3J(8eq,9eq) = 7.7$, $^3J(8eq,9ax) = 3.3$, H_{eq}-C(8)); 2.31 (ddd, $^2J =$

12.0, $^3J(8_{\text{ax}},9_{\text{ax}}) = 7.4$, $^3J(8_{\text{ax}},9_{\text{eq}}) = 3.6$, $H_{\text{ax}}\text{-C}(8)$); 2.11 – 2.00 (*m*, $H_{\text{eq}}\text{-C}(10)$); 1.99 – 1.90 (*m*, $H_{\text{ax}}\text{-C}(10)$); 1.81 – 1.71, 1.62 – 1.52 (*m*, $\text{CH}_2(9)$).

^{13}C -NMR (100 MHz, Aceton- d_6): 139.8 ($\text{C}(1')$); 129.4 ($\text{C}(3')$, $\text{C}(5')$); 129.3 ($\text{C}(2')$, $\text{C}(6')$); 128.0 ($\text{C}(4')$); 81.7 (*dd*, $^2J(1,\text{P}) = 8.8$, $^3J(1,\text{F}) = 1.2$, $\text{C}(1)$); 67.7 (*d*, $^2J(5,\text{P}) = 6.8$, $\text{C}(5)$); 58.5 ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 57.0 (*d*, $^3J(6,\text{P}) = 9.0$, $\text{C}(6)$); 49.0 ($\text{C}(8)$); 28.8 (*d*, $^3J(10,\text{P}) = 2.7$, $\text{C}(10)$); 22.3 ($\text{C}(9)$).

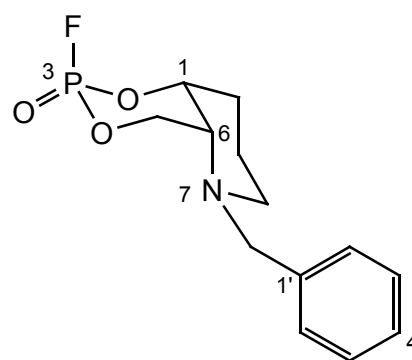
^{31}P -NMR (161.9 MHz, Aceton- d_6): – 15.6 (*dddddd*, $^1J(\text{P},\text{F}) = 990$, $^3J(\text{P},H_{\text{ax}}\text{-C}(5)) = 14.0$, $^3J(\text{P},H\text{-C}(1)) = 12.8$, $^3J(\text{P},H_{\text{eq}}\text{-C}(5)) = 10.9$, $^4J(\text{P},H_{\text{ax}}\text{-C}(10)) = 3.4$, $^4J(\text{P},6) = 1.8$).

^{19}F -NMR (376.5 MHz, Aceton- d_6): – 74.5 (*dq*, $^1J(\text{F},\text{P}) = 990$, $^4J(\text{F},H\text{-C}(1)) \approx ^4J(\text{F},H_{\text{ax}}\text{-C}(5)) \approx ^5J(\text{F},H_{\text{eq}}\text{-C}(10)) \approx 2.4$).

MS (EI): 285 (25, M^+), 194 (13, $[M - \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2]^+$), 186 (15), 172 (22), 160 (41), 91 (100, $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2]^+$), 65 (11).

7.4.8 (–)-*cis*-(1*R*,3*S*,6*R*)-3-Fluoro-2,4-dioxo-7-aza-7-benzyl-3-phospha-bicyclo-[4.4.0]decan 3-Oxid

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{FNO}_3\text{P}$ (285.24)



(–)-6ax

Die Synthese von (–)-**6ax** und (–)-**6eq** erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie oben für (+)-**6ax** und (+)-**6eq** beschrieben.

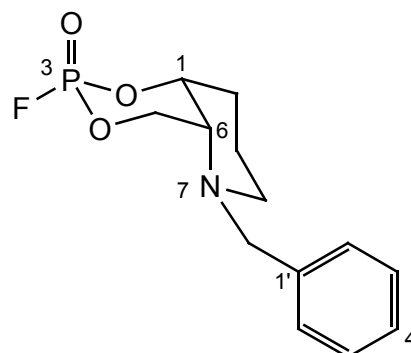
Es wurde mit einem Ansatz von 105 mg (0.47 mmol) (–)-**4** gearbeitet. Man erhielt 48 mg (0.17 mmol, 36%) mg von (–)-**6ax** als farblose Kristalle und und 54 mg (0.19 mmol, 40%) von (–)-**6eq** als farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{25} = -59.8$ ($c = 0.36$, Aceton)

Die übrigen physikalischen Daten sind mit denen der enantiomeren Verbindungen (+)-**6ax** in jeder Hinsicht identisch.

7.4.9 (–)-*cis*-(1*R*,3*R*,6*R*)-3-Fluoro-2,4-dioxo-7-aza-7-benzyl-3-phospha-bicyclo-[4.4.0]decan 3-Oxid

C₁₃H₁₇FNO₃P (285.24)



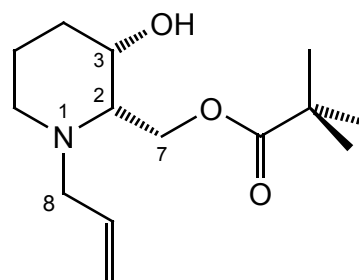
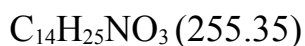
(–)-6eq

$[\alpha]_D^{25} = -22.3$ (c = 0.25, Aceton).

Die übrigen physikalischen Daten sind mit denen der enantiomeren Verbindungen (+)-**6eq** in jeder Hinsicht identisch.

7.5 Herstellung der racemischen *N*-allylierten Dirole

7.5.1 (±)-*cis*-(2*RS*,3*RS*)-1-Allyl-2-(2,2 dimethylpropoxy-1-oxomethyl)piperidin-3-ol



(±)-**16**

In einer 60 ml Teflonhülse wurden 6 g 2-(Hydroxymethyl)piperidin-3-ol · HCl (35.9 mmol, 85%, Rest NaCl) in 30 ml H₂O gelöst (pH = 3) und mit 1.4 g Rh (5% auf Al₂O₃) versetzt. Das Gemisch wurde im Autoklaven während 24 h bei 35°C unter 60 bar H₂ gerührt. Anschliessend wurde der Katalysator über einen Fiberglasfilter abfiltriert und das Wasser mit Ethanol azeotrop abdestilliert.

5g (29.8 mmol) des erhaltenen 2-(Hydroxymethyl)piperidin-3-ols · HCl (mit *ca.* 15% NaCl) wurden in 50 ml H₂O gelöst und mit 8 g (75.4 mmol) Na₂CO₃, 80 ml EtOH und mit 2.8 ml Allylbromid (32 mmol) versetzt und während 6 h unter Rückfluss erhitzt (95°C).

Am RV wurde das EtOH abgezogen und die wässrige Phase mit AcOEt extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit K₂CO₃ getrocknet und am RV abgezogen. Das leicht gelbliche Öl wurde anschliessend am HV getrocknet. Die Ausbeute an (±)-**15** betrug 3.8 g (22.2 mmol, *ca.* 74%). Gemäss ¹H- und ¹³C-NMR enthielt das Öl 95% *cis*-Diol ((±)-**15**) und 5% *trans*-Diol ((±)-**18**).

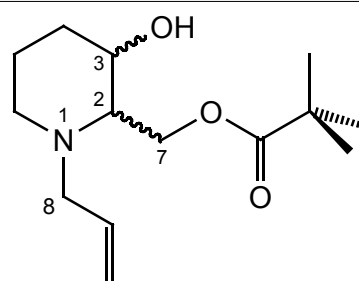
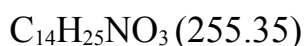
In einem 50 ml Dreihalsrundkolben mit Innenthermometer und Tropftrichter wurden 2.95 g (17.2 mmol) Diol ((±)-**15**) in 15 ml Pyridin gelöst (17.3 mmol) und auf – 30°C (i-PrOH/CO₂(s)) gekühlt. Anschliessend wurden 2.3 ml (18.7 mmol) Pivalinsäurechlorid in 15 ml Pyridin zugetropft, so dass die Temperatur des Reaktionsgemisches nie über – 20°C stieg. Das Gemisch wurde nach abgeschlossener Zugabe für zwei Tage bei – 20°C im Kühlschrank stehen gelassen.

Das Pyridin wurde anschliessend im Vakuum abdestilliert. Dabei war eine starke Schaumbildung zu beobachten. Der orange-rote Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit 2 M NaOH-Lsg. geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über K₂CO₃ getrocknet, das LM am RV abgezogen und zweimal mit Toluol koevaporiert. Das gelbliche Öl wurde am HV getrocknet. Die Ausbeute an (±)-**16** betrug 4.3 g (16.8 mmol, 98%).

Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

Experimentelle Daten: siehe S. 196, *Kapitel 7.5.4* ((±)-**16**).

7.5.2 (±)-cis/trans-1-Allyl-2-(2,2 dimethyl-propoxy-1-oxo-methyl)piperidin-3-ol (1:1)



(±)-**17**/(±)-**16**

SWERN-Oxidation: In einem 250 ml Dreihalskolben mit Septum und Tropftrichter wurden unter Stickstoffatmosphäre 1.7 ml (19.8 mmol) Oxalylchlorid in 15 ml abs. CH₂Cl₂ vorgelegt und auf – 78°C (Aceton/ CO₂ (s)) gekühlt. Danach wurden 2.5 ml (35.2 mmol) DMSO (*extra dry* über Molekularsieb) in 15 ml abs. CH₂Cl₂ zur Lösung zugetropft und 10 min rühren gelassen. Anschliessend wurden 3.96 g (15.5 mmol) (±)-**16** in 15 ml abs. CH₂Cl₂ langsam zur Reaktionslösung getropft, sodass die Temperatur nie über – 60°C stieg. Nach der Zugabe von (±)-**16** wurden bei *ca.* – 70°C 10.8 ml (77.5 mmol) Et₃N zugegeben. Dabei verfärbte sich die Lösung zuerst schwach orange, dann blass rosa und zum Schluss intensiv gelb. Während 20 min wurde das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt und für weitere 20 min rühren gelassen.

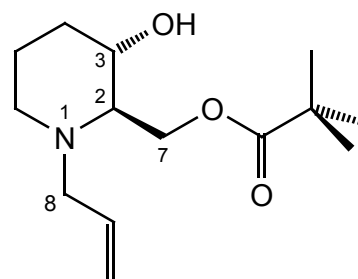
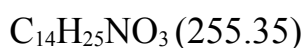
Reduktion: Bei RT wurden zur nun dunkelgelben Reaktionslösung 70 ml EtOH gegeben und auf – 15°C abgekühlt. Dabei verfärbte sich die Lösung dunkelorange.

Anschliessend wurde 950 mg (25.1 mmol) NaBH₄ in Portionen *ca.* alle 10 min zugegeben. Bei der Zugabe blieb die Temperatur stets zwischen – 10°C bis – 15°C. Die Lösung verfärbte sich während der Reaktion hellorange.

Die Aufarbeitung erfolgte bei – 10°C durch Zugabe von *ca.* 50 ml 10% H₂SO₄ und einigen Minuten Rühren. Nach der Hydrolyse war die Lösung hellgelb. Am RV wurden die organischen LM entfernt, die wässrige Lösung mit konz. NaOH basisch gestellt und mit Et₂O extrahiert. Die etherischen Phasen wurden mit NaCl-Lsg. gewaschen, über K₂CO₃ getrocknet und am RV abdestilliert. Das gelbliche Öl wurde anschliessend am HV getrocknet. Die Rohausbeute an *cis/trans*-Gemisch ((±)-**17**/((±)-**16**) betrug 3.4 g (13.3 mmol, 86%). Mittels GC/MS konnte ein Diastereoisomerenverhältnis von 1:1 bestimmt werden.

Die diastereoisomeren Verbindungen konnten säulenchromatographisch (SiO₂, AcOEt/Hexan 3:1, 0.5% Et₃N) voneinander getrennt werden, wobei die Trennung mehrmals durchgeführt werden musste, da jeweils mehr als 50% als Mischfraktion anfielen. Man erhielt so *ca.* 1.3 g (5.1 mmol, 33 %) *trans*-Produkt (±)-**17** und *ca.* 1.1 mg (4.3 mmol, 28%) *cis*-Produkt (±)-**16**. *Ca.* 15 % blieben als Mischfraktion übrig und die restlichen 25% gingen während der Trennung aufgrund von Zersetzung auf Silicagel verloren. Trotz diesen Schwierigkeiten wurde auf eine Optimierung der Trennung verzichtet.

7.5.3 (±)-*trans*-(2*RS*,3*SR*)-1-Allyl-2-(2,2 dimethylpropoxy-1-oxomethyl)piperidin-3-ol



(±)-**17**

Erscheinungsbild: gelbliches Öl.

DC: *R_f* (AcOEt) = 0.29.

GC: $t_R = 8.9$ min.

IR (Film): 3436 m , 3078 w , 2973 s , 2959 s , 2938 s , 2871 s , 2801 s , 2722 w , 1728 s , 1643 w , 1539 w , 1481 s , 1462 s , 1444 m , 1418 m , 1398 s , 1365 m , 1286 s , 1227 m , 1161 s , 1073 s , 1033 s , 995 m , 920 s , 865 w , 805 w , 770 m , 734 w , 649 w , 597 w , 586 w , 562 w , 524 w , 505 w .

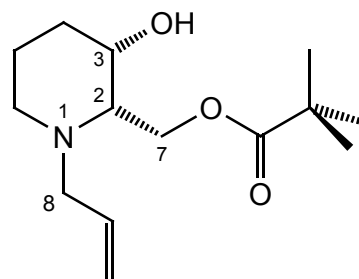
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.83 (X von ABX , $^3J(9,10_{\text{trans}}) = 17.1$, $^3J(9,10_{\text{cis}}) = 10.1$, $^3J(9,B) = 6.6$, $^3J(9,A) = 6.2$, H-C(9)); 5.17 (dtd , $^3J(10_{\text{trans}},9) = 17.1$, $^2J \approx ^4J(10_{\text{trans}},A) = 1.6$; $^4J(10_{\text{trans}},B) = 1.2$, H-C(10 $_{\text{trans}}$)); 5.13 (dtd , $^3J_{\text{cis}} = 10.1$, $^2J \approx ^4J(10_{\text{cis}},A) = 1.6$; $^4J(10_{\text{cis}},B) = 1.2$, H-C(10 $_{\text{cis}}$)); 4.43, 4.27 (A und B von ABX , $^2J = 12.1$, $^3J(A,2) = 4.5$, $^3J(B,2) = 4.3$, H $_2$ -C(7)); 4.07 ($br. s$, OH); 3.58 (ddd , $^3J(3,4_{\text{ax}}) = 7.5$, $^3J(3,2) = 6.4$, $^3J(3,4_{\text{eq}}) = 3.6$, H-C(3)); 3.32, 3.13 (A und B von ABX , $^2J = 14.2$, $^3J(B,9) = 6.6$, $^3J(A,9) = 6.2$, $^4J(A,10_{\text{trans}}) \approx ^4J(A,10_{\text{cis}}) = 1.6$; $^4J(B,10_{\text{trans}}) \approx ^4J(B,10_{\text{cis}}) = 1.2$, H $_2$ -C(8)); 2.68 (ddd , $^2J = 11.7$, $^3J = 6.6$, $^3J = 3.4$, H $_{\text{eq}}$ -C(6)); 2.57 (X von ABX , $^3J(2,3) = 6.4$, $^3J(2,A) = 4.5$, $^3J(2,B) = 4.3$, H-C(2)); 2.32 (ddd , $^2J = 11.7$, $^3J = 7.8$, $^3J = 3.7$, H $_{\text{ax}}$ -C(6)); 1.89-1.64 (m , H $_{\text{eq}}$ -C(4,5)); 1.57 – 1.39 (m , H $_{\text{ax}}$ -C(4,5)); 1.20 (s , 3 CH $_3$ ($t\text{Bu}$)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 179.0 (C=O); 135.4 (C(9)); 117.3 (C(10)); 67.1 (C(3)); 65.2 (C(2)); 60.6 (C(7)); 57.5 (C(8)); 48.9 (C(6)); 38.9 (C($t\text{Bu}$)), 29.7 (C(4)); 27.2 (3 CH $_3$ ($t\text{Bu}$)), 21.5 (C(5)).

MS (EI): 254 (<1, $[M - \text{H}]^+$); 252 (4, $[M - 3\text{H}]^+$); 151 (20); 140 (100, $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}^+$); 138 (40); 122 (14, $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}^+$); 110 (67); 96 (10); 82 (5); 70 (14); 57 (88, C_4H_9^+).

7.5.4 (\pm)-*cis*-(2*RS*,3*RS*)-1-Allyl-2-(2,2 dimethylpropoxy-1-oxomethyl)piperidin-3-ol

$\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ (255.35)



(\pm)-16

Erscheinungsbild: gelbliches Öl.

DC: R_f (AcOEt) = 0.20.

GC: t_R = 9.1 min.

IR (Film): 3436 m , 3078 w , 2973 s , 2959 s , 2937 s , 2871 s , 2808 s , 2722 w , 1728 s , 1642 w , 1542 w , 1480 s , 1460 s , 1442 m , 1419 m , 1398 s , 1365 m , 1284 s , 1228 m , 1159 s , 1071 m , 1034 m , 998 m , 980 m , 952 w , 919 m , 866 w , 837 w , 801 w , 771 m , 723 w , 651 w , 602 w , 586 w , 562 w , 537 w , 522 w , 502 w .

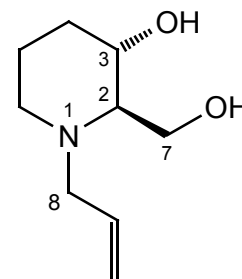
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.88 (X von ABX , $^3J(9,10_{\text{trans}}) = 17.2$, $^3J(9,10_{\text{cis}}) = 10.2$, $^3J(9,B) = 7.0$, $^3J(9,A) = 5.8$, H-C(9)); 5.19 (dtd , $^3J(10_{\text{trans}},9) = 17.2$, $^2J \approx ^4J(10_{\text{trans}},A) = 1.6$, $^4J(10_{\text{trans}},B) = 1.0$, H-C(10_{trans})); 5.16 (dtd , $^3J(10_{\text{cis}},9) = 10.2$, $^2J \approx ^4J(10_{\text{cis}},A) = 1.6$, $^4J(10_{\text{cis}},B) = 1.0$, H-C(10_{cis})); 4.32, 4.27 (A und B von ABX , $^2J = 11.5$, $^3J(A,2) = 5.5$, $^3J(B,2) = 5.3$, $\text{H}_2\text{-C}(7)$); 3.88 (dt , $^3J(3,4_{\text{eq}}) = 4.7$, $^3J(3,2) \approx ^3J(3,4_{\text{ax}}) = 2.1$, H-C(3)); 3.34, 2.96 (A und B von ABX , $^2J = 14.4$, $^3J(B,9) = 7.0$, $^3J(A,9) = 5.8$, $^4J(A,10_{\text{trans}}) \approx ^4J(A,10_{\text{cis}}) = 1.6$, $^4J(B,10_{\text{trans}}) \approx ^4J(B,10_{\text{cis}}) = 1$, $\text{H}_2\text{-C}(8)$); 2.82 (dtd , $^2J = 11.7$, $^3J(6_{\text{eq}},5_{\text{ax}}) \approx ^3J(6_{\text{eq}},5_{\text{eq}}) = 3.8$, $^4J = 1.7$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(6)$); 2.72 ($br. s$, OH); 2.56 (X von ABX , $^3J(2,A) = 5.5$, $^3J(2,B) = 5.3$, $^3J(2,3) = 2.1$, H-C(2)); 2.17 (td , $^2J \approx ^3J(6_{\text{ax}},5_{\text{ax}}) = 11.7$, $^3J(6_{\text{ax}},5_{\text{eq}}) = 3.0$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(6)$); 1.89 – 1.72 (m , $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(4,5)$); 1.56-1.41 (m , $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(4,5)$); 1.21 (s , 3 CH_3 ($t\text{Bu}$)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 178.4 (C=O); 134.5 (C(9)); 118.0 (C(10)); 64.1 (C(3)); 63.8 (C(2)); 60.6 (C(7)); 57.0 (C(8)); 51.9 (C(6)); 38.7 (C($t\text{Bu}$)), 31.0 (C(4)); 27.2 (3 CH_3 ($t\text{Bu}$)), 20.3 (C(5)).

MS (EI): 254 (9, $[M - \text{H}]^+$); 141 (11); 140 (100, $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}^+$); 122 (7, $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}^+$); 110 (5); 96 (5); 70 (10); 57 (41, C_4H_9^+).

7.5.5 (±)-*trans*-(2*RS*,3*SR*)-1-Allyl-(2-hydroxy-methyl)piperidin-3-ol

C₉H₁₇NO₂ (171.24)



(±)-18

In einem 50 ml Zweihalsrundkolben wurden 748 mg (2.93 mmol) von (±)-**17** in 15 ml EtOH gelöst und mit einer Lösung von 600 mg (10.7 mmol) KOH in 15 ml H₂O versetzt. Nach 5 h Rühren bei RT wurde das EtOH am RV abgezogen und die wässrige Phase mehrmals mit AcOEt extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung gewaschen und mit K₂CO₃ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am RV abgezogen und der Rückstand am HV getrocknet. Man erhielt 426 mg (2.49 mmol, 85%) (±)-**18** als farbloses Öl.

Erscheinungsbild: farbloses Öl.

DC: R_f (AcOEt) = 0.09.

GC: t_R = 7.5 min.

IR (Film): 3381s (*br.*), 3075s, 2938s, 2860s, 2808s, 2871s, 2722w, 1846w, 1737w, 1642m, 1443s, 1418s, 1368m, 1334m, 1275s, 1243m, 1214w, 1181w, 1115s, 1071s, 1030s, 995s, 918s, 851w, 835w, 801w, 775w, 672w, 655w, 560w, 520w, 474w.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 5.81 (*X* von *ABX*, $^3J(9,10_{trans}) = 17.5$, $^3J(9,10_{cis}) = 10.3$, $^3J(9,B) = 7.4$, $^3J(9,A) = 5.7$, H-C(9)); 5.11 (*dtd*, $^3J(10_{trans},9) = 17.5$, $^2J \approx ^4J(10_{trans},A) = 1.5$, $^4J(10_{trans},B) = 1$, H-C(10_{trans})); 5.09 (*dtd*, $^3J(10_{cis},9) = 10.3$, $^2J \approx ^4J(10_{cis},A) = 1.5$, $^4J(10_{cis},B) = 1$, H-C(10_{cis})); 3.90, 3.75 (*A* und *B* von *ABX*, $^2J = 11.4$, $^3J(A,2) = 2.5$, $^3J(B,2) = 4.2$, H₂-C(7)); 3.59 (*ddd*, $^3J(3,4_{ax}) = 10.2$, $^3J(3,2) = 8.4$, $^3J(3,4_{eq}) = 4.4$, H-C(3)); 3.35, 3.01 (*A* und *B* von *ABX*, $^2J = 14.3$, $^3J(B,9) = 7.4$, $^3J(A,9) = 5.7$, $^4J(A,10_{trans}) \approx ^4J(A,10_{cis}) = 1.5$, $^4J(B,10_{trans}) \approx ^4J(A,10_{cis}) = 1$, H₂-C(8)); 3.32 (*br. s*, 2 OH); 2.79 (*dt*, $^2J = 11.6$, $^3J(6_{eq},5_{ax}) \approx ^3J(6_{eq},5_{eq}) = 3.6$, H_{eq}-C(6)); 2.17 (*td*, $^2J \approx$

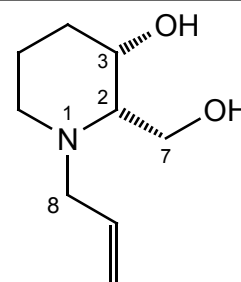
$^3J(6_{\text{ax}},5_{\text{ax}}) = 11.4$, $^3J(6_{\text{ax}},5_{\text{eq}}) = 3.2$, $H_{\text{ax}}\text{-C}(6)$); 2.05 (X von ABX , $^3J(2,3) = 8.4$, $^3J(2,A) = 2.5$, $^3J(2,B) = 4.2$, $H\text{-C}(2)$); 1.92 (m , dq -ä hn l., $^2J = 12.2$, $H_{\text{eq}}\text{-C}(5)$); 1.66 – 1.56 (m , dq -ä hn l., $H\text{-C}(4)$); 1.53-1.37 (m , qt -ä hn l., $H\text{-C}(4)$); 1.26 (tdd , $^2J \approx ^3J = 12.2$, $^3J = 10.4$, $^3J = 4.1$, $H_{\text{ax}}\text{-C}(5)$).

$^{13}\text{C}\text{-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 134.2 ($\text{C}(9)$); 118.0 ($\text{C}(10)$); 67.8 ($\text{C}(3)$); 66.9 ($\text{C}(2)$); 58.7 ($\text{C}(7)$); 56.4 ($\text{C}(8)$); 51.4 ($\text{C}(6)$); 32.8 ($\text{C}(4)$); 22.5 ($\text{C}(5)$).

MS (EI): 171 (1, M^+); 140 (100, $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}^+$); 141 (11); 122 (1, $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}^+$); 112 (8); 98 (16); 82 (4); 70 (28); 68 (11); 55 (7).

7.5.6 **(±)-*cis*-(2*RS*,3*RS*)-1-Allyl-(2-hydroxy-methyl)piperidin-3-ol**

$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_2$ (171.24)



(±)-15

In einem 50 ml Zweihalsrundkolben wurden 407 mg (1.59 mmol) von (±)-**16** in 15 ml EtOH gelöst und mit einer Lösung von 330 mg (5.9 mmol) KOH in 15 ml H_2O versetzt. Nach 5 h Rühren bei RT wurde das EtOH am RV abgezogen und die wässrige Phase mehrmals mit AcOEt extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung gewaschen und mit K_2CO_3 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am RV abgezogen und der Rückstand am HV getrocknet. Man erhielt 232 mg (1.35 mmol, 85%) (±)-**15** als farbloses Öl.

Erscheinungsbild: farbloses Öl.

DC: R_f (AcOEt) = 0.09.

GC: $t_R = 7.2$ min.

IR (Film): 3374s (*br.*), 3077s, 2939s, 2860s, 2808s, 2240w, 1846w, 1736w, 1642m, 1443s, 1419s, 1383m, 1360m, 1329m, 1274m, 1222m, 1191m, 1121s, 1090s, 1062s,

1022s, 995s, 920s, 879m, 834m, 798m, 732s, 645m, 561m, 459w.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 5.83 (*X* von *ABX*, $^3J(9,10_{\text{trans}}) = 17.4$, $^3J(9,10_{\text{cis}}) = 10.1$, $^3J(9,\text{B}) = 7.4$, $^3J(9,\text{A}) = 5.7$, H-C(9)); 5.11 (*dtd*, $^3J(10_{\text{trans}},9) = 17.4$, $^2J \approx ^4J(10_{\text{trans}},\text{A}) = 1.3$, $^4J(10_{\text{trans}},\text{B}) < 1.0$, H-C(10_{trans})); 5.09 (*dtd*, $^3J(10_{\text{cis}},9) = 10.1$, $^2J \approx ^4J(10_{\text{cis}},\text{A}) = 1.3$, $^4J(10_{\text{cis}},\text{B}) < 1$, H-C(10_{cis})); 4.00-3.95 (*m*, $w_{1/2} = 11$, H-C(3)); 3.92 (*br. s*, 2 OH); 3.87, 3.74 (*A* und *B* von *ABX*, $^2J = 11.6$, $^3J(\text{A},2) = 5.5$, $^3J(\text{B},2) = 3.6$, H₂-C(7)); 3.30, 3.06 (*A* und *B* von *ABX*, $^2J = 14.2$, $^3J(\text{B},9) = 7.4$, $^3J(\text{A},9) = 5.7$, $^4J(\text{A},10_{\text{trans}}) \approx ^4J(\text{A},10_{\text{cis}}) = 1.3$, $^4J(\text{B},10_{\text{trans}}) \approx ^4J(\text{B},10_{\text{cis}}) < 1$, H₂-C(8)); 2.74 (*ddd*, $^2J = 11.6$, $^3J = 4.6$, $^3J = 2.8$, H_{eq}-C(6)); 2.34 (*X* von *ABX*, *quint*-ähnl., H-C(2)); 2.19 (*ddd*, $^2J = 11.6$, $^3J = 10.3$, $^3J = 2.7$, H_{ax}-C(6)); 1.85 – 1.66 (*m*, H_{eq}-C(4,5)); 1.50 – 1.36 (*m*, H_{ax}-C(4,5)).

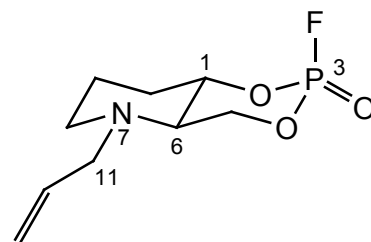
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 134.2 (C(9)); 117.9 (C(10)); 68.8 (C(3)); 63.6 (C(2)); 61.2 (C(7)); 56.6 (C(8)); 51.1 (C(6)); 30.9 (C(4)); 20.3 (C(5)).

MS (EI): 171 (1, *M*⁺); 140 (100, C₈H₁₄NO⁺); 141 (11); 122 (2, C₈H₁₂N⁺); 112 (8); 98 (15); 82 (4); 70 (27); 68 (11); 55 (7).

7.6 Synthese der *N*-allylierten racemischen Acetylcholinmimetika

7.6.1 (±)-*trans*-(1*RS*,3*RS*,6*SR*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7-allyl-3-phosphabicyclo-[4.4.0]decan 3-Oxid

C₉H₁₅FNO₃P (235.19)



(±)-**19ax**

In einem 10 ml Zweihalsrundkolben wurden 103 mg (0.60 mmol) (±)-**18** in 1 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst, mit 170 µl (1.22 mmol) Et₃N versetzt und für *ca.* 20 Minuten mittels Eisbad gekühlt. In einem separaten 10 ml Einhalsspitzkolben mit Septum wurden aus der *glove box* unter N₂-Atmosphäre 56 µl (87.8 mg, 0.64 mmol) POCl₂F in 1 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und ausgeschleust. Die POCl₂F-Lsg. wurde ebenfalls mittels Eisbad gekühlt.

Nach *ca.* 10 Minuten Kühlen wurde die POCl₂F-Lsg. mit einer Spritze mit langer, gebogener Nadel (verhindert Tropfen) in den Zweihalsrundkolben überführt. Die Reaktion wurde nach ein bis zwei Minuten abgebrochen. Dazu wurde die Reaktionslösung mit einer Spritze mit gebogener Nadel entnommen und über wenig Silicagel filtriert.

Zur Verbesserung der Ausbeute wurde das restliche Ammoniumsalz im Reaktionskolben mit 5 ml CH₂Cl₂ versetzt und während 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Die resultierende Lösung filtrierte man jeweils auch Silicagel. Das Lösungsmittel wurde zur Schonung der Verbindungen mit N₂ abgeblasen.

Die Trennung der Diastereoisomeren konnte säulenchromatographisch (3 g SiO₂, Et₂O) innerhalb von 10 – 15 min durchgeführt werden.

So erhielt man 32 mg (0.14 mmol, 23%) von (±)-**19ax** und 47 mg (0.20 mmol, 33%) von (±)-**19eq** als gelbliche Öle. (±)-**19eq** epimerisiert in CDCl₃ in kürzester Zeit, sodass in den ¹H-NMR Spektren immer auch das Epimer (±)-**19ax** zu sehen ist.

Mittels DC konnte allerdings gezeigt werden, dass (±)-**19eq** nach der Trennung als reines Epimer vorliegt.

Erscheinungsbild: bei RT gelbliches Öl, bei -20°C wachsartig gelb.

DC: $R_f(\text{Et}_2\text{O}) = 0.34$.

GC: $t_R = 9.6$ min.

IR (KBr): 3536 w , 3078 w , 3010 w , 2951 m , 2871 w , 2814 m , 2722 w , 1882 w , 1738 w , 1643 w , 1446 w , 1421 w , 1393 w , 1339 s , 1281 m , 1242 w , 1195 w , 1157 m , 1126 m , 1055 s , 1002 s , 970 m , 954 w , 927 m , 882 s , 837 w , 811 w , 787 m , 680 w (*br.*), 557 w , 527 w , 504 w , 484 m , 472 m .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 5.78 (X von ABX , $^3J(12,13_{\text{trans}}) = 17.2$, $^3J(12,13_{\text{cis}}) = 10.2$, $^3J(12,B) = 7.7$, $^3J(12,A) = 5.3$, H-C(12)); 5.17 (*dtd*, $^3J(13_{\text{cis}},12) = 10.2$, $^2J \approx ^4J(13_{\text{cis}},A) = 1.5$, $^4J(13_{\text{cis}},B) < 1$, H-C(13 $_{\text{cis}}$)); 5.15 (*dtd*, $^3J(13_{\text{trans}},12) = 17.2$, $^2J \approx ^4J(13_{\text{trans}},A) = 1.5$, $^4J(13_{\text{trans}},B) < 1$, H-C(13 $_{\text{trans}}$)); 4.62 (A von $ABX-P$, $^3J(5_{\text{eq}},P) = 25.2$, $^2J = 10.7$, $^3J(5_{\text{eq}},6) = 4.3$, H $_{\text{eq}}$ -C(5)); 4.20 (m_c , H-C(1)); 4.18 (B von $ABX-P$, $^2J = ^3J(5_{\text{ax}},6) = 10.7$, $^3J(5_{\text{ax}},P) < 1$, H $_{\text{ax}}$ -C(5)); 3.17, 2.93 (A und B von ABX , $^2J = 14.7$, $^3J(B,12) = 7.7$, $^3J(A,12) = 5.3$, $^4J(A,13_{\text{trans}}) \approx ^4J(A,12_{\text{cis}}) = 1.5$, $^4J(B,13_{\text{trans}}) \approx ^4J(B,13_{\text{cis}}) < 1$, H $_2$ C(11)); 2.81 (m , *dq*-ähnl., H $_{\text{eq}}$ -C(8)); 2.56 (X von $ABX-P$, $^3J(6,5_{\text{ax}}) = 10.7$, $^3J(6,1) \approx 9.0$, $^3J(6,5_{\text{eq}}) = 4.3$, H-C(6)); 2.22 (*td*, $^2J = ^3J(8_{\text{ax}},9_{\text{ax}}) = 11.8$, $^3J(8_{\text{ax}},9_{\text{eq}}) = 3.0$, H $_{\text{ax}}$ -C(8)); 2.14 – 2.03 (m , H $_{\text{eq}}$ -C(10)); 1.79 – 1.42 (m , H $_2$ -C(9), H $_{\text{ax}}$ -C(10)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 132.5 (C(12)); 119.1 (C(13)); 81.9 (*dd*, $^2J(1,P) = 6.7$, $^3J(1,F) \approx 1.0$, C(1)); 71.6 (*d*, $^2J(5,P) = 7.7$, C(5)); 59.8 (*d*, $^3J(6,P) = 4.8$, C(6)); 56.2 (C(11)); 52.4 (C(8)); 30.9 (*d*, $^3J(10,P) = 9.5$, C(10)); 22.9 (*d*, $^4J(9,P) = 2.3$, C(9)).

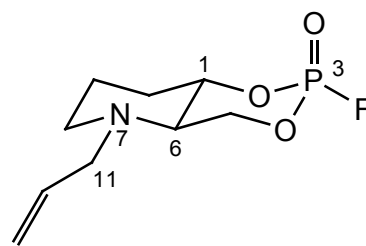
$^{31}\text{P-NMR}$ (161.9 MHz, CDCl_3): -15.8 (*dd*, $^1J(\text{P},F) = 1013$, $^3J(\text{P},\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5)) = 25.2$).

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (282.4 MHz, CDCl_3): -87.4 (*d*, $^1J(\text{F},\text{P}) = 1013$).

MS (EI): 235 (9, M^+); 208 (7); 194 (4, $[M - \text{C}_3\text{H}_5]^+$); 136 (29); 122 (68, $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}^+$); 110 (100); 96 (32); 80 (34); 68 (34); 54 (34).

7.6.2 (±)-trans-(1*RS*,3*SR*,6*SR*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7-allyl-3-phosphabicyclo-[4.4.0]decan 3-Oxid

C₉H₁₅FNO₃P (235.19)



(±)-19eq

Erscheinungsbild: gelbliches Öl.

DC: R_f (Et₂O) = 0.19.

GC: t_R = 9.6 min.

IR (Film): 3536w, 3078w, 2951m, 2871w, 2815m, 2722w, 1887w, 1643w, 1476w, 1445w, 1422w, 1395w, 1334s, 1286m, 1227w, 1193w, 1153m, 1125m, 1079s, 1059s, 1008s, 982m, 969m, 950m, 927m, 880s, 839w, 804w, 778m, 679w, 668w, 616w, 556w, 527w, 509w, 500w, 489w.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 5.78 (*X* von *ABX*, $^3J(12,13_{trans}) = 17.2$, $^3J(12,13_{cis}) = 10.0$, $^3J(12,B) = 8.2$, $^3J(12,A) = 5.1$, H-C(12)); 5.16 (*dq*, $^3J(13_{cis},12) = 10.0$, $^2J \approx ^4J(13_{cis},A) \approx ^4J(13_{cis},B) < 1$, H-C(13_{cis})); 5.15 (*dq*, $^3J(13_{trans},12) = 17.2$, $^2J \approx ^4J(13_{trans},A) \approx ^4J(13_{trans},B) < 1$, H-C(13_{trans})); 4.61 (*A* von *ABX-P*, $^2J = 10.3$, $^3J(5eq,P) = 9.4$, $^3J(5eq,6) = 5.5$, H_{eq}-C(5)); 4.26 (*B* von *ABX-P*, $^3J(5ax,P) = 13.5$, $^2J \approx ^3J(5ax,6) = 10.3$, $^4J(5ax,F) = 3.0$, H_{ax}-C(5)); 4.24 (*m_c*, $^3J(1,6) = 9.5$, $^3J(1,P) = 1.6$, H-C(1)); 3.12, 2.83 (*A* und *B* von *ABX*, $^2J = 14.5$, $^3J(B,12) = 8.2$, $^3J(A,12) = 5.1$, $^4J(A,13_{trans}) \approx ^4J(A,12_{cis}) \approx ^4J(B,13_{trans}) \approx ^4J(B,13_{cis}) < 1$, H₂C(11)); 2.89 – 2.77 (*m*, H_{eq}-C(8)); 2.65 (*X* of *ABX*, $^3J(6,5ax) = 10.3$, $^3J(6,1) = 9.5$, $^3J(6,5eq) = 5.5$, $^5J(6,F) = 3.8$, H-C(6)); 2.21 – 2.09 (*m*, H_{eq}-C(10)); 2.08 (*td*, $^2J = ^3J(8ax,9ax) = 11.8$, $^3J(8ax,9eq) = 2.7$, H_{ax}-C(8)); 1.77 – 1.66 (*m*, H_{eq}-C(9)); 1.59 – 1.39 (*m*, H_{ax}-C(9), H_{ax}-C(10)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 132.5 (C(12)); 119.2 (C(13)); 81.9 (*dd*, $^2J(1,P) = 6.2$, $^3J(1,F) \approx 1.0$, C(1)); 72.1 (*d*, $^2J(5,P) = 7.7$, C(5)); 59.1 (*d*, $^3J(6,P) = 10.2$, C(6)); 56.3 (C(11)); 52.0 (C(8)); 31.0 (*d*, $^3J(10,P) = 7.7$, C(10)); 22.7 (*d*, $^4J(9,P) = 1.7$, C(9)).

³¹P-NMR (161.9 MHz, CDCl₃): – 14.8 (*dddt*, $^1J(P,F) = 997$, $^3J(P,H_{ax}-C(5)) = 13.5$,

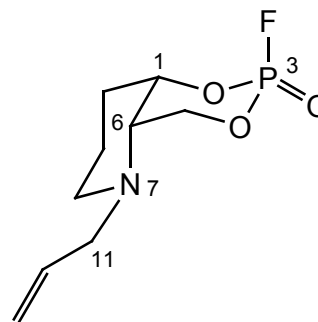
$^3J(\text{P}, \text{H}_{\text{eq}}-\text{C}(5)) = 9.4$, $^3J(\text{P}, \text{H}-\text{C}(1)) \approx ^4J(\text{P}, \text{H}_{\text{eq}}-\text{C}(10)) = 1.6$).

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (282.4 MHz, CDCl_3): -73.1 (*d*, $^1J(\text{F}, \text{P}) = 997$).

MS (EI): 235 (7, M^+); 208 (6); 194 (3, $[M - \text{C}_3\text{H}_5]^+$); 136 (24); 122 (57, $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}^+$); 110 (100); 96 (27); 80 (29); 68 (31); 54 (31).

7.6.3 **(±)-*cis*-(1*RS*,3*RS*,6*RS*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7-allyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid**

$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{FNO}_3\text{P}$ (235.19)



(±)-20ax

In einem 10 ml Zweihalsrundkolben wurden 121 mg (0.71 mmol) (±)-**15** in 1 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst, mit 200 μl (1.44 mmol) Et_3N versetzt und für *ca.* 20 Minuten mittels Eisbad gekühlt. In einem separaten 10 ml Einhalsspitzkolben mit Septum wurden aus der *glove box* unter N_2 -Atmosphäre 66 μl (103.5 mg, 0.75 mmol) POCl_2F in 1 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst und ausgeschleust. Die POCl_2F -Lsg. wurde ebenfalls mittels Eisbad gekühlt.

Nach *ca.* 10 Minuten Kühlen wurde die POCl_2F -Lsg. mit einer Spritze mit langer, gebogener Nadel (verhindert Tropfen) in den Zweihalsrundkolben überführt. Die Reaktion wurde nach ein bis zwei Minuten abgebrochen. Dazu wurde die Reaktionslösung mit einer Spritze mit gebogener Nadel entnommen und über wenig Silicagel filtriert.

Zur Verbesserung der Ausbeute wurde das restliche Ammoniumsalz im Reaktionskolben mit 5 ml CH_2Cl_2 versetzt und während 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Die resultierende Lösung filtrierte man jeweils auch über wenig Silicagel. Das Lösungsmittel wurde zur Schonung der Verbindungen mit N_2 abgeblasen.

Die Trennung der Diastereoisomeren konnte säulenchromatographisch (3 g SiO_2 ,

Et₂O) innerhalb von 10 – 15 min durchgeführt werden.

So erhielt man 57 mg (0.242 mmol, 34.0%) von (±)-**20ax** als gelbliches Öl und 56 mg (0.238 mmol, 33.5%) von (±)-**20eq** als gelbliches Wachs. Im ³¹P-NMR Spektrum von (±)-**20ax** konnte man rund 5% *trans*-Decalin (±)-**19ax** feststellen. Dieser kleine Anteil an (±)-**19ax** wurde chromatographisch abgetrennt und die Verbindung (±)-**20ax** als diastereoisomerenreine Substanz in den enzymkinetischen Experimenten eingesetzt.

Erscheinungsbild: bei RT gelbliches Öl, bei – 20°C wachsartig fest.

DC: *R_f* (Et₂O) 0.27.

GC: *t_R* = 9.8 min.

IR (Film): 3515_w, 3077_w, 3010_w, 2949_s, 2862_w, 2804_m, 1729_w, 1642_w, 1486_m, 1464_w, 1446_m, 1421_w, 1376_m, 1326_s, 1249_m, 1224_m, 1203_m, 1153_m, 1123_s, 1086_s, 1037_s, 991_s, 930_m, 904_s, 871_s, 850_s, 825_s, 787_w, 756_s, 666_w, 648_w, 639_w, 559_w, 538_m, 509_w, 495_w, 474_s, 453_w.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 5.83 (*X* von *ABX*, ³*J*(12,13_{trans}) = 17.0, ³*J*(12,13_{cis}) = 10.4, ³*J*(12,B) = 8.1, ³*J*(12,A) = 5.2, H-C(12)); 5.15 (*dtd*, ³*J*(13_{trans},12) = 17.0, ²*J* ≈ ⁴*J*(13_{trans},A) = 1.6, ⁴*J*(13_{trans},B) < 1, H-C(13_{trans})); 5.14 (*dtd*, ³*J*(13_{cis},12) = 10.4, ²*J* ≈ ⁴*J*(13_{cis},A) = 1.6, ⁴*J*(13_{cis},B) < 1, H-C(13_{cis})); 4.67 (*m_c*, *w*_{1/2} ≈ 8, H-C(1)); 4.66 (*A* von *ABX-P*, ³*J*(5eq,P) = 25.4, ²*J* = 12.7, ³*J*(5eq,6) = 1.8, H_{eq}-C(5)); 4.21 (*B* von *ABX-P*, ²*J* = 12.7; ³*J*(5ax,6) ≈ ³*J*(5ax,P) = 1.1, H_{ax}-C(5)); 3.35, 3.18 (*A* und *B* von *ABX*, ²*J* = 15.0, ³*J*(B,12) = 8.1, ³*J*(A,12) = 5.2, ⁴*J*(A,13_{trans}) ≈ ⁴*J*(A,13_{cis}) = 1.6, ⁴*J*(B,13_{trans}) ≈ ⁴*J*(B,13_{cis}) < 1, H₂C(11)); 2.93 (*m*, *dquint*-ähnl., H_{eq}-C(8)); 2.41 (*X* von *ABX-P*, ³*J*(6,1) = ³*J*(6,5ax) = ³*J*(6,5eq) = ⁴*J*(6,P) = 1.8, H-C(6)); 2.31 (*td*, ²*J* = ³*J*(8ax,9ax) = 11.8, ³*J*(8ax,9eq) = 2.4, H_{ax}-C(8)); 2.07 – 1.87 (*m*, H_{eq}-C(10), H_{eq}-C(9)); 1.61 – 1.41 (*m*, H_{ax}-C(9), H_{ax}-C(10)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 133.0 (C(12)); 118.5 (C(13)); 80.0 (*dd*, ²*J*(1,P) = 7.7, C(1)); 69.1 (*d*, ²*J*(5,P) = 6.8, C(5)); 56.7 (*d*, ³*J*(6,P) = 5.3, C(6)); 56.1 (C(11)); 51.9

(C(8)); 29.9 (*d*, $^3J(10,P) = 8.9$, C(10)); 19.6 (C(9)).

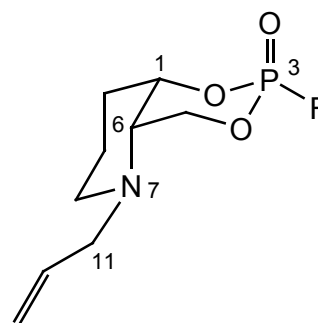
^{31}P -NMR (161.9 MHz, CDCl_3): – 16.2 (*dddd*, $^1J(\text{P},\text{F}) = 998$, $^3J(\text{P},\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5)) = 25.4$, $^4J(\text{P},\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(10)) = 6.8$, $^4J(\text{P},6) = 1.8$).

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (282.4 MHz, CDCl_3): – 85.1 (*d*, $^1J(\text{F},\text{P}) = 998$).

MS (EI): 235 (13, M^+); 208 (7); 194 (3, $[M - \text{C}_3\text{H}_5]^+$); 136 (26); 122 (47, $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}^+$); 110 (100); 96 (25); 82 (25); 68 (29); 54 (24).

7.6.4 **(±)-*cis*-(1*RS*,3*SR*,6*RS*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-7-aza-7-allyl-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid**

$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{FNO}_3\text{P}$ (235.19)



(±)-20eq

Erscheinungsbild: wachsartig gelb.

DC: R_f (Et_2O) 0.14.

GC: $t_R = 9.7$ min.

IR (KBr): 3423*m* (*br.*), 3086*w*, 3014*m*, 2958*s*, 2865*m*, 2827*m*, 2744*w*, 1727*w*, 1642*m*, 1494*m*, 1474*m*, 1447*m*, 1422*m*, 1381*m*, 1328*s*, 1307*s*, 1249*m*, 1225*m*, 1202*m*, 1160*s*, 1122*s*, 1086*s*, 1059*s*, 992*s*, 937*s*, 925*s*, 905*s*, 877*s*, 847*s*, 815*s*, 766*w*, 758*w*, 731*m*, 663*w*, 640*w*, 560*w*, 553*w*, 538*w*, 513*w*, 504*w*, 495*w*, 485*w*, 465*m*.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): 5.75 (*X* von *ABX*, $^3J(12,13_{\text{trans}}) = 17.2$, $^3J(12,13_{\text{cis}}) = 10.1$, $^3J(12,\text{B}) = 7.1$, $^3J(12,\text{A}) = 5.8$, H-C(12)); 5.16 (*dtd*, $^3J(13_{\text{trans}},12) = 17.2$, $^2J \approx ^4J(13_{\text{trans}},\text{A}) = 1.3$, $^4J(13_{\text{trans}},\text{B}) \approx 1$, H-C(13_{trans})); 5.14 (*dtd*, $^3J(13_{\text{cis}},12) = 10.1$, $^2J \approx ^4J(13_{\text{cis}},\text{A}) = 1.3$, $^4J(13_{\text{cis}},\text{B}) \approx 1$, H-C(13_{cis})); 4.67 (*m_c*, $^3J(1,\text{P}) = 12.8$, $^3J(1,6) = 3.7$, H-C(1)); 4.64 (*A* von *ABX-P*, $^2J = 11.6$, $^3J(5_{\text{eq}},\text{P}) = 9.9$, $^3J(5_{\text{eq}},6) = 7.4$, H_{eq}-C(5)); 4.33 (*B* von *ABX-P*, $^3J(5_{\text{ax}},\text{P}) = 15.0$, $^2J = 11.6$, $^3J(5_{\text{ax}},6) = 3.0$, $^4J(5_{\text{ax}},\text{F}) \approx 1.9$, H_{ax}-C(5)); 3.25, 3.14 (*A* und *B* von *ABX*, $^2J = 14.2$, $^3J(\text{B},12) = 7.1$, $^3J(\text{A},12) = 5.8$, $^4J(\text{A},13_{\text{trans}}) \approx$

$^4J(\text{A},13_{\text{cis}}) = 1.3$, $^4J(\text{B},13_{\text{trans}}) \approx ^4J(\text{B},13_{\text{cis}}) \approx 1$, $\text{H}_2\text{C}(11))$; 3.09 (X von $ABX\text{-}P$, $^3J(6,5_{\text{eq}}) = 7.4$, $^3J(6,5_{\text{ax}}) \approx ^3J(6,1) = 3.7$, $^4J(6,P) = 1.3$, $\text{H-C}(6))$; 2.59 (ddd , $^2J = 12.0$, $^3J(8_{\text{eq}},9_{\text{eq}}) = 8.2$, $^3J(8_{\text{eq}},9_{\text{ax}}) = 3.2$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(8))$; 2.42 (ddd , $^2J = 12.0$, $^3J(8_{\text{ax}},9_{\text{ax}}) = 6.7$, $^3J(8_{\text{ax}},9_{\text{eq}}) = 3.8$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(8))$; 2.02 – 1.71 (m , $\text{CH}_2(10)$, $\text{H-C}(9))$; 1.59 – 1.44 (m , $\text{H-C}(9))$.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): 134.0 ($\text{C}(12)$); 118.4 ($\text{C}(13)$); 80.2 (d , $^2J(1,P) = 8.4$, $\text{C}(1)$); 71.6 (d , $^2J(5,P) = 6.3$, $\text{C}(5)$); 56.9 ($\text{C}(11)$); 55.0 (d , $^3J(6,P) = 8.6$, $\text{C}(6)$); 48.3 ($\text{C}(8)$); 27.8 (d , $^3J(10,P) = 2.0$, $\text{C}(10)$); 21.6 ($\text{C}(9)$).

^{31}P -NMR (161.9 MHz, CDCl_3): – 16.1 ($dddddd$, $^1J(\text{P},\text{F}) = 1003$, $^3J(\text{P},\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5)) = 15.0$, $^3J(\text{P},\text{H-C}(1)) = 14.2$, $^3J(\text{P},\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5)) = 9.9$, $^4J(\text{P},\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(10)) = 2.8$, $^4J(\text{P},6) = 1.3$).

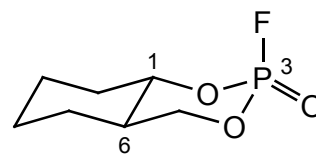
$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (282.4 MHz, CDCl_3): – 76.1 (d , $^1J(\text{F},\text{P}) = 1003$).

MS (EI): 235 (13, M^+); 208 (7); 194 (2, $[M - \text{C}_3\text{H}_5]^+$); 136 (29); 122 (58, $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}^+$); 110 (100); 96 (29); 82 (29); 68 (35); 54 (29).

7.7 Synthese der optisch aktiven carbocyclischen Organophosphate

7.7.1 (–)-*trans*-(1*S*,3*S*,6*R*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid

C₇H₁₂FO₃P (194.16)



(–)-**7ax**

Nach [1] resp. [82] wurde das (+)-*trans*-2-Hydroxymethylcyclohexanol hergestellt und für die Synthese von (–)-**7ax** und (–)-**7eq** eingesetzt.

In einem 25 ml Zweihalsrundkolben mit Stickstoffaufsatz und Septum wurden 113 mg (0.87 mmol) (+)-*trans*-2-Hydroxymethylcyclohexanol in 3 ml abs. Et₂O gelöst und mit 125 µl abs. Pyridin versetzt. Man kühlte die Lösung mittels Eisbad auf *ca.* 0°C. In einem separaten 10 ml Einhalsspitzkolben mit Septum wurden in der *glove box* unter N₂ 110 µl (172.5 mg, 1.26 mmol, *ca.* 1.5 äq.) POCl₂F in 1 ml abs. Et₂O gelöst und ausgeschleust. Die POCl₂F-Lsg. wurde ebenfalls mit Eiswasser gekühlt.

Mit einer Spritze mit langer, gebogener Nadel (verhindert Tropfen) wurde die POCl₂F-Lsg. durch das Septum in den Zweihalsrundkolben überführt. Unmittelbar nach der Zugabe bildete sich das Pyridiniumsalz als weisser Niederschlag. Die Reaktion wurde nach ein bis zwei Minuten abgebrochen. Dazu wurde die Reaktionslösung mit einer Spritze mit gebogener Nadel entnommen und über wenig Silicagel (pH = 5.5) filtriert.

Zur Verbesserung der Ausbeute wurde das restliche Pyridiniumsalz im Reaktionskolben mit 5 ml Et₂O versetzt und während 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Die resultierende Lösung filtrierte man jeweils auch über saures Silicagel. Das Lösungsmittel wurde zur Schonung der Verbindungen mit N₂ abgeblasen. Mittles DC (Et₂O/Hexan 3:1) und GC-MS überprüfte man die Reaktion auf ihre Vollständigkeit.

Die Trennung der Diastereoisomeren konnte säulenchromatographisch (12 g SiO₂ (pH = 5.5), Et₂O/Hexan 3:1) durchgeführt werden. So erhielt man 62.6 mg (0.32 mmol, 37%) von (–)-**7ax** und 63 mg (0.32 mmol, 37%) von (–)-**7eq** als farblose Kristalle.

Erscheinungsbild: farblose Prismen.

Smp.: 106 – 107°C.

DC: R_f (Et₂O/Hexan 3:1) = 0.25.

GC: t_R = 9.9 min.

$[\alpha]_D^{25} = -13.9$ ($c = 0.98$, Aceton).

IR (CHCl₃): 3030_w, 2946_m, 2866_w, 1474_w, 1453_w, 1330_s, 1248_w, 1164_m, 1134_w, 1103_m, 1094_m, 1066_s, 1053_s, 1037_s, 995_s, 976_m, 963_m, 951_m, 900, 886_s, 868_m, 854_m, 838_w, 626_m.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆): 4.40 (*A* von *ABX-P*, $^2J = 11.0$, $^3J(5eq,6) = 4.5$, $^3J(5eq,P) = 24.8$, H_{eq}-C(5)); 4.35 (*dt*, $^3J(1,6) = ^3J(1,10ax) = 10.8$, $^3J(1,10eq) = 4.5$, H-C(1)); 4.24 (*B* von *ABX-P*, $^2J = ^3J(5ax,6) = 11.0$, $^3J(5ax,P) < 1$, H_{ax}-C(5)); 2.09 (*m*, $w_{1/2} \approx 20$, H_{eq}-C(10)); 2.03 (*m*, $w_{1/2} \approx 25$, *X* von *ABX-P*, H-C(6)); 1.86 (*m*, *br. d*-ähnl., $w_{1/2} \approx 25$, $^2J \approx 12$, H_{eq}-C(9)); 1.77 – 1.72 (*m*, H_{eq}-C(7), H_{eq}-C(8)); 1.56 (*br. qd*-ähnl., $^2J \approx 12.5$, $^3J(10ax,1) \approx ^3J(10ax,9ax) \approx 11$, $^3J(10ax,9eq) = 3.5$, H_{ax}-C(10)); 1.38 (*sext.t*-ähnl., $^2J \approx 12.5$, $^3J(8ax,7ax) \approx ^3J(8ax,9ax) \approx ^3J(9ax,10ax) \approx 11$, $^3J(8ax,7eq) \approx ^3J(8ax,9eq) \approx ^3J(9ax,8eq) \approx ^3J(9ax,10eq) \approx 3.5$, H_{ax}-C(8), H_{ax}-C(9)); 1.11 (*qd*, $^2J = ^3J(7ax,6) = ^3J(7ax,8ax) = 12.5$, $^3J(7ax,8eq) = 3.5$, H_{ax}-C(7)).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-d₆): 85.5 (*dd*, $^2J(1,P) = 7.4$, $^3J(1,F) = 1.8$, C(1)); 74.9 (*dd*, $^2J(5,P) = 7.4$, $^3J(5,F) = 1.2$, C(5)); 41.6 (*d*, $^3J(6,P) = 6.2$, C(6)); 33.1 (*d*, $^3J(10,P) = 9.2$, C(10)); 25.4 (*br. ⁴J(7,P) ≈ 1*, C(7)); 24.9 (C(8)); 24.5 (*d*, $^2J(9,P) = 2.5$, C(9)).

³¹P-NMR (161.9 MHz, Aceton-d₆): – 14.7 (*dd*, $^1J(P,F) = 998$ Hz, $^3J(P,H_{eq}-C(5)) = 24.8$).

¹⁹F{¹H}-NMR (282.4 MHz, Aceton-d₆): – 85.4 (*d*, $^1J(F,P) = 998$).

MS (EI): 194 (< 1, M^+), 152 (7), 127 (2), 101 (9), 94 (30), 79 (100), 68 (16), 67 (19), 66 (12), 55 (15), 54 (14), 53 (12).

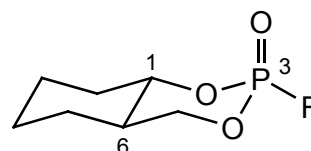
MS (EI, NH₃): 406 (21, [2*M* + NH₄]⁺) 212 (100, [*M* + NH₄]⁺), 195 (3, [*M* + H]⁺).

Kristallstruktur: siehe *Tabelle 24, Kapitel 10.3*, S. 245.

Detaillierte Strukturdaten zur Kristallstruktur und Angaben zum experimentellen Verfahren sind in der kristallographischen Datenbank des Organisch Chemischen Instituts der Universität Zürich unter dem Kürzel **RU0502** abgelegt.

7.7.2 (-)-*trans*-(1*S*,3*R*,6*R*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid

C₇H₁₂FO₃P (194.16)



(-)-7eq

Erscheinungsbild: farblose Plättchen.

Smp.: 64 – 66°C.

DC: *R_f* (Et₂O/Hexan 3:1) = 0.14.

GC: *t_R* = 9.5 min.

[α]_D²⁵ = – 35.1 (c = 0.98, Aceton).

IR (CHCl₃): 3008_w, 2945_m, 2866_m, 1604_w, 1475_w, 1451_w, 1388_w, 1327_s, 1310_s, 1158_w, 1139_w, 1095_m, 1069_s, 1055_m, 1040_s, 1007_m, 962_m, 900_m, 883_m, 868_m, 854_m, 836_w, 635_w.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-*d*₆): 4.47 (*A* von *ABX-P*, ²*J* = ³*J*(5eq,P) = 10.7, ³*J*(5eq,6) = 5.2, H_{eq}-C(5)); 4.46 (*m*, *w*_{1/2} ≈ 25, H-C(1)); 4.28 (*B* von *ABX-P*, ²*J* = ³*J*(5ax,6) = ³*J*(5ax,P) = 10.7, ⁴*J*(5ax,F) = 1.7, H_{ax}-C(5)); 2.19 (*m*, *w*_{1/2} ≈ 25, *X* von *ABX-P*, H-C(6)); 2.13 (*m*, *br. d*-ähnl., *w*_{1/2} ≈ 20, ²*J* ≈ 12, H_{eq}-C(10)); 1.87 – 1.78 (*m*, H_{eq}-C(7), H_{eq}-C(9)); 1.74 (*m*, *br. d*-ähnl., *w*_{1/2} ≈ 18, ²*J* ≈ 12, H_{eq}-C(8)); 1.52 (*br. qd*, ²*J* ≈ ³*J*(10ax,1) ≈ ³*J*(10ax,9ax) ≈ 12, ³*J*(10ax,9eq) = 3.7, H_{ax}-C(10)); 1.37 (*sext.t*-ähnl., ²*J* ≈ 12.5, ³*J*(8ax,7ax) ≈ ³*J*(8ax,9ax) ≈ ³*J*(9ax,10ax) ≈ 11, ³*J*(8ax,7eq) ≈ ³*J*(8ax,9eq) ≈ ³*J*(9ax,8eq) ≈ ³*J*(9ax,10eq) ≈ 3.5, H_{ax}-C(8), H_{ax}-C(9)); 1.12 (*qd*, ²*J* = ³*J*(7ax,6) =

$^3J(7_{ax},8_{ax}) = 12.5$, $^3J(7_{ax},8_{eq}) = 3.5$, $H_{ax}-C(7)$).

^{13}C -NMR (100 MHz, Aceton- d_6): 85.1 (*d*, $^2J(1,P) = 5.8$, C(1)); 74.7 (*d*, $^2J(5,P) = 7.1$, C(5)); 40.3 (*d*, $^3J(6,P) = 13.2$, C(6)); 33.4 (*d*, $^3J(10,P) = 5.9$, C(10)); 26.4 (C(7)); 24.7 (C(8)); 24.3 (C(9)).

^{31}P -NMR (161.9 MHz, Aceton- d_6): – 14.6 (*dtd*, $^1J(P,F) = 983$, $^3J(P,H_{ax}-C(5)) = ^3J(P,H_{eq}-C(5)) = 10.7$), $^3J(P,H-C(1)) \approx 1.5$).

$^{19}F\{^1H\}$ -NMR (282.4 MHz, Aceton- d_6): – 67.3 (*d*, $^1J(F,P) = 983$).

MS (EI): 194 (1, M^+), 152 (15), 139 (4), 127 (2), 101 (18), 94 (47), 79 (100), 68 (24), 67 (28), 66 (18), 55 (21), 54 (20), 53 (17).

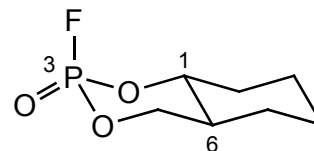
MS (EI, NH_3): 406 (9, $[2M + NH_4]^+$) 212 (100, $[M + NH_4]^+$), 195 (2, $[M + H]^+$).

Kristallstruktur: siehe *Tabelle 24, Kapitel 10.3*, S. 245.

Detaillierte Strukturdaten zur Kristallstruktur und Angaben zum experimentellen Verfahren sind in der kristallographischen Datenbank des Organisch Chemischen Instituts der Universität Zürich unter dem Kürzel **RU0503** abgelegt.

7.7.3 (+)-*trans*-(1*R*,3*R*,6*S*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid

$C_7H_{12}FO_3P$ (194.16)



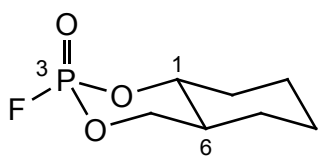
(+)-7ax

Nach [1] resp. [82] wurde das (–)-*trans*-2-Hydroxymethylcyclohexanol hergestellt und für die Synthese von (+)-7ax und (+)-7eq eingesetzt.

Die Synthese erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie oben für (–)-7ax und (–)-7eq beschrieben. Es wurde mit einem Ansatz von 90 mg (0.69 mmol) (–)-*trans*-2-Hydroxymethylcyclohexanol gearbeitet. Man erhielt 49 mg (0.25 mmol, 36%) von (+)-7ax und 51 mg (0.26 mmol, 38%) von (+)-7eq als farblose Prismen, resp. Plättchen.

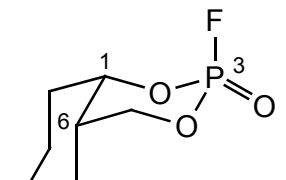
$[\alpha]_D^{25} = +14.2$ ($c = 1.06$, Aceton).

Die übrigen physikalischen Daten sind mit jenen der enantiomeren Verbindung (–)-**7ax** in jeder Hinsicht identisch.

7.7.4 (+)- <i>trans</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid C ₇ H ₁₂ FO ₃ P (194.16)	 (+)-7eq
---	---

$[\alpha]_D^{25} = +35.6$ ($c = 1$, Aceton).

Die übrigen physikalischen Daten sind mit jenen der enantiomeren Verbindung (–)-**7eq** in jeder Hinsicht identisch.

7.7.5 (+)- <i>cis</i> -(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid C ₇ H ₁₂ FO ₃ P (194.16)	 (+)-8ax
---	---

Nach [1] resp. [82] wurde das (+)-*cis*-2-Hydroxymethylcyclohexanol hergestellt und für die Synthese von (+)-**8ax** und (–)-**8eq** eingesetzt.

In einem 25 ml Zweihalsrundkolben mit Stickstoffaufsatz und Septum wurden 100 mg (0.77 mmol) (+)-*cis*-2-Hydroxymethylcyclohexanol in 3 ml abs. Et₂O gelöst und mit 125 µl abs. Pyridin versetzt. Man kühlte die Lösung mittels Eisbad auf *ca.* 0°C. In einem separaten 10 ml Einhalsspitzkolben mit Septum wurde in der *glove box* unter N₂ 110 µl (172.5 mg, 1.26 mmol, *ca.* 1.5 äq.) POCl₂F in 1 ml abs. Et₂O gelöst und ausgeschleust. Die POCl₂F-Lsg. wurde ebenfalls mit Eiswasser gekühlt.

Mit einer Spritze mit langer, gebogener Nadel (verhindert Tropfen) wurde die POCl₂F-Lsg. durch das Septum in den Zweihalsrundkolben überführt. Unmittelbar nach der Zugabe bildete sich das Pyridiniumsalz als weisser Niederschlag. Die Reaktion wurde nach ein bis zwei Minuten abgebrochen. Dazu wurde die Reaktionslösung mit einer Spritze mit gebogener Nadel entnommen und über wenig Silicagel (pH = 5.5) filtriert.

Zur Verbesserung der Ausbeute wurde das restliche Pyridiniumsalz im Reaktionskolben mit 5 ml Et₂O versetzt und für 5 min ins Ultraschallbad gestellt. Die resultierende Lösung filtrierte man jeweils auch über saures Silicagel. Das Lösungsmittel wurde zur Schonung der Verbindungen mit N₂ abgeblasen. Mittels DC (Et₂O/Hexan 2:1) und GC-MS überprüfte man die Reaktion auf ihre Vollständigkeit. Die Trennung der Diastereoisomeren konnte säulenchromatographisch (15 g SiO₂, Et₂O/Hexan 2:1) durchgeführt werden. So erhielt man 50.8 mg (0.26 mmol, 34%) von (+)-**8ax** als viskoses gelbliches Öl und 25 mg (0.13 mmol, 17%) von (–)-**8eq** als farblose Kristalle.

Erscheinungsbild: leicht gelbliches, viskoses Öl.

DC: R_f (Et₂O/Hexan 3:1) = 0.15.

GC: t_R = 8.3 min.

$[\alpha]_D^{25} = +18.3$ ($c = 2.55$, Aceton).

IR (CHCl₃): 3030_w, 2945_m, 2871_w, 1474_w, 1450_m, 1434_w, 1371_w, 1325_s, 1157_w, 1113_m, 1092_s, 1067_s, 1014_s, 987_s, 959_m, 916_m, 899_s, 874_m, 846_m, 826_m, 621_w.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆): 4.98 (*q*-ähnl., $^3J(1,6) \approx ^3J(1,10ax) \approx ^3J(1,10eq) \approx 2$, H-C(1)); 4.63 (*A* von *ABX-P*, $^2J = 11.4$, $^3J(5ax,P) = 2.7$, $^3J(5ax,6) \approx 0$, H_{ax}-C(5)); 4.30 (*B* von *ABX-P*, $^2J = 11.4$, $^3J(5eq,P) = 25.3$, $^3J(5eq,6) = 1.3$, H_{eq}-C(5)); 2.02 (*br. d*-ähnl., $w_{1/2} \approx 18$, $^2J \approx 13$, H_{eq}-C(10)); 1.97 (*m*, $w_{1/2} \approx 25$, *X* von *ABX-P*, H-C(6)); 1.81 (*m*, *dt*-ähnl., $w_{1/2} \approx 25$, H_{eq}-C(7), H_{eq}-C(8)); 1.74 – 1.63 (*m*, H_{ax}-C(8), H_{ax}-C(10)); 1.58 – 1.49 (*m*, *tt*-ähnl., CH₂(9)); 1.41 (*qd*-ähnl., $w_{1/2} \approx 25$, H_{ax}-C(7)).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-d₆): 82.0 (*dd*, $^2J(1,P) = 7.1$, $^3J(1,F) = 1.8$, C(1)); 75.8

(*dd*, $^2J(5,P) = 7.12$, $^3J(5,F) = 1.2$, C(5)); 36.5 (*d*, $^3J(6,P) = 5.3$, C(6)); 31.8 (*d*, $^3J(10,P) = 9.2$, C(10)); 25.2 (C(7)); 23.6 (C(8)); 19.7 (C(9)).

^{31}P -NMR (161.9 MHz, Aceton- d_6): – 14.9 (*dddd*, $^1J(P,F) = 996$, $^3J(P,H_{\text{eq}}\text{-C}(5)) = 25.3$, $^3J(P,H_{\text{ax}}\text{-C}(5)) = 2.7$, $^4J(P,H_{\text{ax}}\text{-C}(10)) = 7.3$)

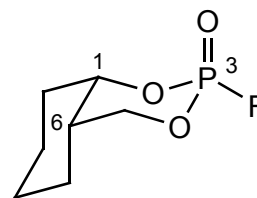
$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -NMR (282.4 MHz, Aceton- d_6): – 85.2 (*d*, $^1J(F,P) = 996$).

MS (EI): 194 (< 1, M^+), 152 (9), 139 (2), 127 (1), 101 (13), 94 (45), 79 (100), 68 (19), 67 (23), 66 (14), 55 (16), 54 (17), 53 (13).

MS (EI, NH_3): 406 (100, $[2M + \text{NH}_4]^+$) 212 (97, $[M + \text{NH}_4]^+$), 389 (16, $[2M + \text{H}]^+$) 195 (2, $[M + \text{H}]^+$).

7.7.6 (–)-*cis*-(1*S*,3*R*,6*S*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid

$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{FO}_3\text{P}$ (194.16)



(–)-8eq

Erscheinungsbild: farblose Tabletten.

Smp.: 56 – 58°C.

DC: R_f (Et₂O/Hexan 3:1) = 0.04.

GC: t_R = 8.1 min.

$[\alpha]_D^{25} = -7.6$ ($c = 0.73$, Aceton).

IR (CHCl_3): 3008_w, 2946_m, 2869_w, 1482_w, 1453_w, 1344_m, 1324_s, 1151_w, 1116_w, 1092_m, 1076_m, 1062_s, 1017_m, 1001_m, 982_m, 949_m, 922_m, 892_m, 865_m, 822_w, 628_w.

^1H -NMR (400 MHz, Aceton- d_6): 4.86 (*m*, *dquint.*-ähnl., $^3J(1,P) = 14.8$, $^3J(1,10_{\text{ax}}) = 9.1$, $^3J(1,6) = ^3J(1,10_{\text{eq}}) = ^4J(1,F) = 4.4$, $^4J(1,5_{\text{ax}}) < 1$, H-C(1)); 4.62 (*A* von *ABX-P*, $^2J = 11.4$, $^3J(5_{\text{eq}},6) = 8.5$, $^3J(5_{\text{eq}},P) = 7.7$, $H_{\text{eq}}\text{-C}(5)$); 4.50 (*B* von *ABX-P*, $^2J = 11.4$, $^3J(5_{\text{ax}},P) = 17.0$, $^3J(5_{\text{ax}},6) = 4.3$, $^4J(5_{\text{ax}},F) = 1.5$, $H_{\text{ax}}\text{-C}(5)$); 2.49 (*m*, *sept.*-ähnl., *X* von *ABX-P*, $w_{1/2} \approx 20$, H-C(6)); 1.96 (*m*, $w_{1/2} \approx 25$, $\text{CH}_2(10)$); 1.79 (*m*, $w_{1/2} \approx 20$, $H_{\text{eq}}\text{-C}(10)$).

C(7)); 1.74 (*m*, $w_{1/2} \approx 20$, H_{eq} -C(8)); 1.71 (*m*, *br. q*-ähnl., $w_{1/2} \approx 25$, $^2J \approx ^3J(7_{ax},6) \approx ^3J(7_{ax},8_{ax}) \approx 11$, $^3J(7_{ax},8_{eq}) \approx 4$, H_{ax} -C(8)); 1.45 (*m*, $w_{1/2} \approx 15$, CH₂(9)); 1.44 (*m*, *br. q*-ähnl., $w_{1/2} \approx 25$, $^2J \approx ^3J(8_{ax},7_{ax}) \approx ^3J(8_{ax},9_{ax}) \approx 11$, $^3J(8_{ax},7_{eq}) \approx ^3J(8_{ax},9_{eq}) \approx 4$, H_{ax} -C(8)).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-d₆): 83.5 (*d*, $^2J(1,P) = 7.3$, C(1)); 72.3 (*d*, $^2J(5,P) = 6.6$, C(5)); 35.9 (*d*, $^2J(6,P) = 7.8$, C(6)); 29.6 (*d*, $^3J(10,P) = 3.1$, C(10)); 25.5 (C(7)); 23.3 (C(8)); 22.5 (C(9)).

³¹P-NMR (161.9 MHz, Aceton-d₆): – 15.1 (*dtd*-ähnl., $^1J(P,F) = 983$, $^3J(P,H_{ax}-C(5)) = 17.0$, $^3J(P,H-C(1)) = 14.8$, $^3J(P,H_{eq}-C(5)) = 7.7$).

¹⁹F{¹H}-NMR (282.4 MHz, Aceton-d₆): – 75.1 (*d*, $^1J(F,P) = 983$).

MS (EI): 194 (< 1, M^+), 152 (7), 139 (2), 127 (1), 101 (11), 94 (38), 79 (100), 68 (16), 67 (20), 66 (11), 55 (13), 54 (14), 53 (11).

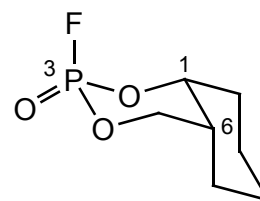
MS (EI, NH₃): 406 (9, $[2M + NH_4]^+$) 212 (100, $[M + NH_4]^+$), 195 (2, $[M + H]^+$).

Kristallstruktur: siehe *Tabelle 24, Kapitel 10.3*, S. 245.

Detaillierte Strukturdaten zur Kristallstruktur und Angaben zum experimentellen Verfahren sind in der kristallographischen Datenbank des Organisch Chemischen Instituts der Universität Zürich unter dem Kürzel **RU0506** abgelegt.

7.7.7 (–)-cis-(1*R*,3*R*,6*R*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid

C₇H₁₂FO₃P (194.16)



(–)-8ax

Nach [1] resp. [82] wurde das (–)-*cis*-2-Hydroxymethylcyclohexanol hergestellt und für die Synthese von (–)-**8ax** und (+)-**8eq** eingesetzt.

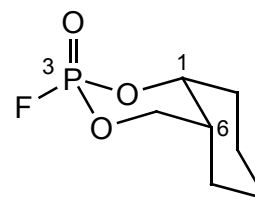
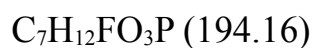
Die Synthese erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie oben für (+)-**8ax** und (–)-**8eq** beschrieben. Es wurde mit einem Ansatz von 100 mg (0.77 mmol) (–)-*cis*-2-Hydroxymethylcyclohexanol gearbeitet. Man erhielt 70.9 mg (0.37 mmol, 47%) von

(–)-**8ax** als gelbliches viskoses Öl und 55 mg (0.29 mmol, 37%) von (+)-**8eq** als farblose Kristalle.

$$[\alpha]_D^{25} = -18.0 \text{ (c = 3.55, Aceton).}$$

Die übrigen physikalischen Daten sind mit jenen der enantiomeren Verbindung (+)-**8ax** in jeder Hinsicht identisch.

7.7.8 (+)-cis-(1*R*,3*S*,6*R*)-3-Fluoro-2,4-dioxa-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-Oxid



(+)-8eq

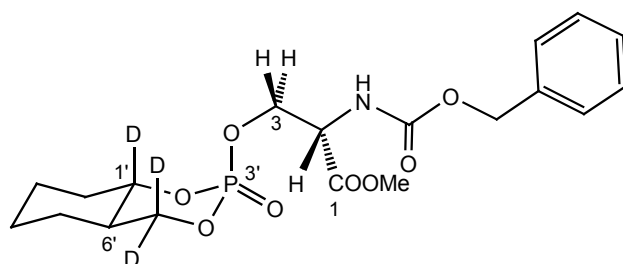
$$[\alpha]_D^{25} = +9.4 \text{ (c = 1, Aceton).}$$

Die übrigen physikalischen Daten sind mit jenen der enantiomeren Verbindung (–)-**8eq** in jeder Hinsicht identisch.

7.8 Carbocyclische Modellverbindungen

7.8.1 *trans*-(1'*RS*,3'*RS*,6'*SR*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-*O*-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phospho-(1',5',5'-²H₃)bicyclo[4.4.0]dec-3'-yl)-*L*-serin Methylester

C₁₉H₂₃D₃NO₈P (430.4)



d-21ax

Die Synthese der Modellverbindungen erfolgte nach [74].

In einem 50 ml Zweihalsrundkolben wurden 275 µl (3.02 mmol) POCl₃ und 260 µl (3.22 mmol) Pyridin in 10 ml Et₂O vorgelegt und mittels Eisbad auf 0°C gekühlt. Anschliessend wurden 806 mg (3.17 mmol) ZSME in 5 ml Et₂O zugegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden bei 0°C gerührt, dann gab man 292 mg (2.19 mmol) (±)-*trans*-2-Hydroxy(2,2-²H₂)methyl(1-²H₁)cyclohexan-1-ol und 360 µl (4.45 mmol) Pyridin in 4ml Et₂O zur nun milchig trüben Reaktionslösung und rührte über Nacht bei RT. Dabei fiel das Pyridiniumsalz aus.

Das LM wurde mit N₂ abgeblasen und in CHCl₃ aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit H₂O und einmal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, anschliessend über MgSO₄ getrocknet und am RV eingengt. Die Rohausbeute betrug 1.38 g (146%, aufgrund von Verunreinigungen).

Für die Messung eines ³¹P-NMR Spektrums (in 6 M Guanidin-d₅·DCl/D₂O, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02) wurde mittels präparativer DC (SiO₂, CHCl₃/AcOEt 3:1) ein Gemisch von **d-21ax**/**d-21eq** (ca. 2:1) abgetrennt.

Erscheinungsbild: farbloser Feststoff.

Smp.: 125 – 130°C

DC: $R_f(\text{CHCl}_3/\text{AcOEt } 1:1) = 0.31$.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.38 – 7.32 (*m*, PhCH₂); 5.84 (*br. d*, $^3J(\text{NH}, 2) = 7.7$, NH); 5.15, 5.13 (*AB*, $^2J = 12.5$, PhCH₂); 4.63 (*X* von *ABX-P*, *br. d*-ähn., $w_{1/2} \approx 15$, H-C(2)); 4.50 (*A* von *ABX-P*, *tq*-ähn., H_A-C(3)); 4.38 (*B* von *ABX-P*, *tt*-ähn., H_BC-(3)); 3.81 (*s*, MeO); 2.04 (*dt*, $^2J = 11.5$, $^3J(10'\text{eq}, 9'\text{ax}) \approx ^3J(10'\text{eq}, 9'\text{eq}) \approx 2$, H_{eq}-C(10')); 1.87 (*m*, *br. t*-ähn., H-C(6'), H_{eq}-C(9')); 1.73 (*m*, H_{eq}-C(8')); 1.63 (*dq*, $^2J = 12$, $^3J(7'\text{eq}, 6') \approx ^3J(7'\text{eq}, 8'\text{ax}) \approx ^3J(7'\text{eq}, 8'\text{eq}) \approx 2$, H_{eq}-C(7')); 1.50 (*td*, $^2J \approx ^3J(10'\text{ax}, 9'\text{ax}) \approx 12$, $^3J(10'\text{ax}, 9'\text{eq}) = 3.5$, H_{ax}-C(10')); 1.31 – 1.23 (*m*, H_{ax}-C(8'), H_{ax}-C(9')); 0.87 (*br. qd*, $^2J \approx ^3J(7'\text{ax}, 6') \approx ^3J(7'\text{ax}, 8'\text{ax}) \approx 12$, $^3J(7'\text{ax}, 8'\text{eq}) \approx 4$, H_{ax}-C(7')).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): 169.5 (C(1)); 155.7 (OCON); 136.0 (arom. C); 128.5 (2C), 128.2, 128.1 (2C) (arom. CH); 81.6 (*t*-ähn., $^3J(1', \text{P}) \approx ^1J(1', 2\text{H}) \approx 5$, C(1')); 71.5 (*quint.*-ähn., $^3J(5', \text{P}) \approx ^1J(5', 2\text{H}) \approx 5$, C(5')); 67.2 (PhCH₂); 66.7, 66.6 (beide *d*, $^2J(3, \text{P}) = 5.1, 4.9$, C(3)); 54.5 (*d*, $^3J(2, \text{P}) = 6.7$, C(2)); 52.9 (MeO); 40.5 (*d*, $^3J(6', \text{P}) = 5.9$, C(6')); 32.2 (*d*, $^3J(10', \text{P}) = 9.1$, C(10')); 25.2 (C(7')); 24.2 (C(8')); 23.8 (C(9')).

³¹P{¹H}-NMR (242.9 MHz, CDCl₃): – 6.66 (*t*-ähn., $^3J(\text{P}, ^2\text{H}) = 3.5$).

³¹P{²H}-NMR (242.9 MHz, CDCl₃): – 6.66 (*t*, $^3J(\text{P}, \text{H}_2\text{-C}(3)) = 7.0$).

³¹P{¹H}-NMR (242.9 MHz, CD₃CN/D₂O/0.2M *Tris* (pH 7.8) 11:44:45): – 5.12 (*s*, $w_{1/2} \approx 10$).

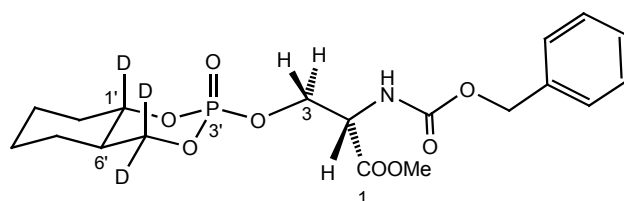
³¹P{¹H}-NMR (202.4 MHz, 6 M Guanidin-d₅·DCl/D₂O, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02): – 4.70 (*s*, $w_{1/2} \approx 12$).

³¹P{²H}-NMR (202.4 MHz, 6 M Guanidin-d₅·DCl/D₂O, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02): – 4.70 (*t*, $^3J(\text{P}, \text{H}_2\text{-C}(3)) = 6.2$).

ESI-MS (MeOH/CHCl₃/NaI): 453 (100, $[M + \text{Na}]^+$, $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{NO}_8\text{P} + \text{Na}]^+$).

7.8.2 *trans*-(1'*RS*,3'*SR*,6'*SR*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-*O*-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phospho-(1',5',5'-²H₃)bicyclo[4.4.0]dec-3'-yl)-*L*-serin Methylester

C₁₉H₂₃D₃NO₈P (430.4)



d-21eq

Erscheinungsbild: leicht grünlich, viskoses Öl.

DC: *R_f*(CHCl₃/AcOEt 1:1) = 0.16.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.36 – 7.30 (*m*, PhCH₂); 5.80 (*t*, ³*J*(NH,2) ≈ ⁴*J*(NH,3) ≈ 7.1, NH); 5.13 (*s*, PhCH₂); 4.57 (*X* von *ABX-P*, *dd*-ähnl., *w*_{1/2} ≈ 15, H-C(2)); 4.50 (*A* von *ABX-P*, *tt*-ähnl., H_A-C(3)); 4.37 (*B* von *ABX-P*, *ddd*-ähnl., H_B-C(3)); 3.77 (*s*, MeO); 2.04 (*m*, *br. dd*-ähnl., H_{eq}-C(10')); 1.89 – 1.80 (*m*, H-C(6'), H_{eq}-C(9')); 1.72 (*m*, *br. d*-ähnl., H_{eq}-C(8')); 1.63 (*m*, *dq*-ähnl., H_{eq}-C(7')); 1.43 (*qd*-ähnl., H_{ax}-C(10')); 1.32 – 1.20 (*m*, *quint.*-ähnl., H_{ax}-C(8'), H_{ax}-C(9')); 0.92 (*m*, *qq*-ähnl., H_{ax}-C(7')).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): 169.2 (C(1)); 155.8 (OCON); 136.1 (arom. C); 128.5 (2C), 128.2, 128.1 (2C) (arom. CH); 81.6 (*t*-ähnl., ³*J*(1',P) ≈ ¹*J*(1',2H) ≈ 5, C(1')); 71.5 (*quint.*-ähnl., ³*J*(5',P) ≈ ¹*J*(5',2H) ≈ 5, C(5')); 67.8, 67.9 (beide *d*, ²*J*(3,P) = 5.5, 6.0, C(3)); 67.1 (PhCH₂); 54.3 (*d*, ³*J*(2,P) = 6.6, C(2)); 52.8 (MeO); 40.5 (*d*, ³*J*(6',P) = 6.7, C(6')); 32.4 (*d*, ³*J*(10',P) = 8.2, C(10')); 25.5 (C(7')); 24.3 (C(8')); 23.8 (C(9')).

³¹P{¹H}-NMR (242.9 MHz, CDCl₃): – 4.12 (*t*-ähnl., ³*J*(P,2H) = 2.5).

³¹P{²H}-NMR (242.9 MHz, CDCl₃): – 4.11, – 4.13 (beide *t*, ³*J*(P,H₂-C(3)) = 6.5).

³¹P{¹H}-NMR (242.9 MHz, CD₃CN/D₂O/0.2M *Tris* (pH 7.8) 11:44:45): – 4.10 (*s*, *w*_{1/2} ≈ 10).

³¹P{¹H}-NMR (202.4 MHz, 6 M Guanidin-d₅·DCl/D₂O, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02): – 3.92 (*s*, *w*_{1/2} ≈ 15).

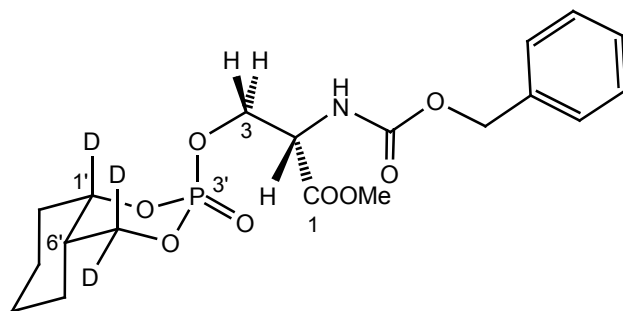
³¹P{²H}-NMR (202.4 MHz, 6 M Guanidin-d₅·DCl/D₂O, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ±

0.02): -3.92 (t , $^3J(\text{P}, \text{H}_2\text{-C}(3)) \approx 5.0$).

ESI-MS (MeOH/CHCl₃/NaI): 453 (100, $[M + \text{Na}]^+$, $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{NO}_8\text{P} + \text{Na}]^+$).

7.8.3 *cis*-(1'*RS*,3'*RS*,6'*RS*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-*O*-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phospho-(1',5',5'-²H₃)bicyclo[4.4.0]dec-3'-yl)-*L*-serin Methylester

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{NO}_8\text{P}$ (430.4)



d-22ax

In einem 50 ml Zweihalsrundkolben wurden 273 μl (3.00 mmol) POCl₃ und 256 μl (3.17 mmol) Pyridin in 5 ml Et₂O vorgelegt und mittels Eisbad auf 0°C gekühlt. Anschliessend wurden 806 mg (3.17 mmol) ZSME in 5 ml Et₂O zugegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden bei 0°C gerührt, dann gab man 400 mg (3.00 mmol) (\pm)-*cis*-2-Hydroxy(2,2-²H₂)methyl(1-²H₁)cyclohexan-1-ol und 485 μl (6.00 mmol) Pyridin in 3 ml Et₂O zur nun milchig trüben Reaktionslösung und rührte über Nacht bei RT. Dabei fiel das Pyridiniumsalz aus.

Das LM wurde mit N₂ abgeblasen und in CHCl₃ aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit H₂O und einmal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, anschliessend über MgSO₄ getrocknet und am RV eingeeengt. Die Rohausbeute betrug 1.32 g (102%, aufgrund von Verunreinigungen).

Die Diastereoisomeren konnten chromatographisch (SiO₂, Et₂O/MeOH 50:1) getrennt werden. Man erhielt 260 mg (0.60 mmol, 20%) von **d-22ax** als farbloser Feststoff und 180 mg (0.42 mmol, 14%) von **d-22eq** als farbloses Öl.

Erscheinungsbild: farbloser Feststoff.

Smp.: 82 – 84°C

DC: $R_f(\text{CHCl}_3/\text{AcOEt } 1:1) = 0.32$.

$R_f(\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH } 50:1) = 0.17$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7.29 – 7.25 (*m*, PhCH_2); 5.82 (*br. d*, $^3J(\text{NH}, 2) = 7.7$, NH); 5.07, 5.05 (*AB*, $^2J = 13$, PhCH_2); 4.53 (*X* von *ABX-P*, *br. dd*-ähn., $w_{1/2} \approx 18$, $\text{H-C}(2)$); 4.39 (*A* von *ABX-P*, *td*-ähn., $\text{H}_A\text{-C}(3)$); 4.30 (*B* von *ABX-P*, *br. t*-ähn., $w_{1/2} \approx 20$, $\text{H}_B\text{-C}(3)$); 3.72 (*s*, MeO); 1.87 (*br. td*-ähn., $^2J \approx 13$, $^2J \approx 3$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(9')$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(10')$); 1.74 (*br. d*-ähn., $^2J \approx 13$, $\text{H-C}(6')$); 1.57 – 1.38, *m*, nicht aufgelöst, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(7')$, $\text{CH}_2(8')$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(9')$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(10')$); 1.21 (*qt*-ähn., $^2J \approx ^3J(7'\text{ax}, 6') \approx ^3J(7'\text{ax}, 8'\text{ax}) \approx 13$, $^3J(7'\text{ax}, 8'\text{eq}) \approx 4$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(7')$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 169.5 ($\text{C}(1)$); 155.7 (OCON); 136.0 (arom. C); 128.4 (2C), 128.1, 128.0 (2C) (arom. CH); *ca.* 78 (*m*, $\text{C}(1')$)18; *ca.* 73 (*m*, $\text{C}(5')$)18; 67.1 (PhCH_2); 66.7, 66.5 (beide *d*, $^2J(3, \text{P}) = 4.3$, 4.2, $\text{C}(3)$); 54.4 (*d*, $^3J(2, \text{P}) = 5.8$, $\text{C}(2)$); 52.8 (MeO); 35.7 (*d*, $^3J(6', \text{P}) = 5.1$, $\text{C}(6')$); 31.1 (*d*, $^3J(10', \text{P}) = 8.6$, $\text{C}(10')$); 24.5 ($\text{C}(7')$); 22.8 ($\text{C}(8')$); 18.6 ($\text{C}(9')$).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (161.9 MHz, CDCl_3): – 6.49 (*s*-ähn., $w_{1/2} \approx 8$).

$^{31}\text{P}\{^2\text{H}\}\text{-NMR}$ (161.9 MHz, CDCl_3): – 6.49 (*m*, $w_{1/2} \approx 22$).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (161.9 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}/0.2\text{M Tris}$ (pH 7.8) 11:44:45): – 5.38 (*t*-ähn., $w_{1/2} \approx 10$).

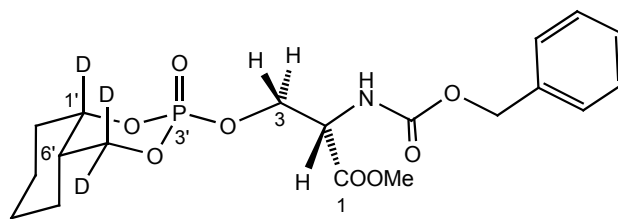
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (202.4 MHz, 6 M Guanidin- $\text{d}_5\cdot\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02): – 4.81 (*s*-ähn., $w_{1/2} \approx 12$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.4 MHz, 6 M Guanidin- $\text{d}_5\cdot\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02): – 4.81 (*s*-ähn., $w_{1/2} \approx 25$).

ESI-MS ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}/\text{NaI}$): 453 (100, $[M + \text{Na}]^+$, $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{NO}_8\text{P} + \text{Na}]^+$).

7.8.4 *cis*-(1'*RS*,3'*SR*,6'*RS*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-*O*-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phospho-(1',5',5'-²H₃)bicyclo[4.4.0]dec-3'-yl)-*L*-serin Methylester

C₁₉H₂₃D₃NO₈P (430.4)



d-22eq

Erscheinungsbild: farbloses, viskoses Öl.

DC: R_f (CHCl₃/AcOEt 1:1) = 0.16.

R_f (Et₂O/MeOH 50:1) = 0.05.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.29 – 7.21 (*m*, PhCH₂); 5.82 (br. *d*, ³*J*(NH,2) = 7.5, NH); 5.06 (*s*, PhCH₂); 4.52 (*X* von *ABX-P*, br. *dt*-ähnl., $w_{1/2} \approx 16$, H-C(2)); 4.46 (*A* von *ABX-P*, *tt*-ähnl., H_A-C(3)); 4.33 (*B* von *ABX-P*, *ddd*-ähnl., H_B-C(3)); 3.71 (*s*, MeO); 2.09 – 1.14 (*m*, nicht aufgelöst, H-C(6'), CH₂(7'), CH₂(8'), CH₂(9'), CH₂(10')).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 169.1 (C(1)); 155.7 (OCON); 136.0 (arom. C); 128.4 (2C), 128.1, 127.9 (2C) (arom. CH); ca. 77 (*m*, C(1')); ca. 71 (*m*, C(5')); 67.9, (*d*, ²*J*(3,P) = 5.3, C(3)); 67.0 (PhCH₂); 54.4 (*d*, ³*J*(2,P) = 5.8, C(2)); 52.8 (MeO); 35.5 (*d*, ³*J*(6',P) = 5.1, C(6')); 30.3 (*d*, ³*J*(10',P) = 7.1, C(10')); 23.9 (C(7')); 23.7 (C(8')); 19.9 (C(9')).

³¹P{¹H}-NMR (161.9 MHz, CDCl₃): – 3.93 (*s*-ähnl., $w_{1/2} \approx 8$).

³¹P{²H}-NMR (161.9 MHz, CDCl₃): – 3.93 (*m*, $w_{1/2} \approx 20$).

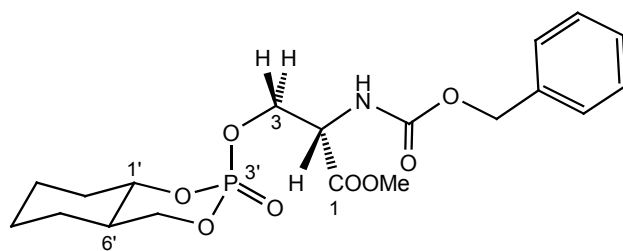
³¹P{¹H}-NMR (161.9 MHz, CD₃CN/D₂O/0.2M *Tris* (pH 7.8) 11:44:45): – 3.77, – 3.95 (beide *s*, $w_{1/2} \approx 10$).

³¹P{¹H}-NMR (202.4 MHz, 6 M Guanidin-d₅·DCl/D₂O, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02): – 3.63, – 3.85 (beide *s*-ähnl., $w_{1/2} \approx 15$).

ESI-MS (CH₂Cl₂/MeCN/NaI): 453 (100, [*M* + Na]⁺, [C₁₉H₂₃D₃NO₈P + Na]⁺).

7.8.5 *trans*-(1'*RS*,3'*RS*,6'*SR*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-*O*-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phosphabicyclo[4.4.0]dec-3'-yl)-*L*-serin Methylester

C₁₉H₂₆NO₈P (427.4)



21ax

Die Synthese der Modellverbindungen erfolgte nach [61].

In einem 50 ml Zweihalsrundkolben wurden 100 µl (1.10 mmol) POCl₃ und 100 µl (1.24 mmol) Pyridin in 2 ml Et₂O vorgelegt und mittels Eisbad auf 0°C gekühlt. Anschliessend wurden 300 mg (1.18 mmol) ZSME in 1 ml Et₂O zugegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden bei 0°C gerührt, dann gab man 140 mg (1.08 mmol) (±)-*trans*-2-Hydroxymethyl-cyclohexan-1-ol und 175 µl (2.16 mmol) Pyridin in 2 ml Et₂O zur milchig trüben Reaktionslösung und rührte über Nacht bei RT.

Das LM wurde mit N₂ abgeblasen und in CHCl₃ aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit H₂O und einmal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Anschliessend wurde über MgSO₄ getrocknet und am RV eingeeengt.

Für die Messung eines ³¹P-NMR Spektrums (in 6 M Guanidin-d₅-DCI/D₂O, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02) wurde mittels präparativer DC (SiO₂, CHCl₃/AcOEt 1:1) ein Gemisch von **21ax**/**21eq** (*ca.* 2:1) abgetrennt.

Erscheinungsbild: farblose Kristalle.

Smp.: 123 – 126°C

DC: *R*_f(CHCl₃/AcOEt 1:1) = 0.25.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.31 – 7.37 (*m*, 5 arom. H); 5.14 (*s*, benzyl-CH₂); 5.83 (*br. d*, ³*J*(NH,2) = 7.5, HN-C(2)); 4.62 (*X* von *ABX-P*, nicht aufgelöst, *d*-ähnl., H-C(2)); 4.37 – 4.50 (*AB* von *ABX-P*, nicht aufgelöst, H₂C(3)); 4.12 (*A* von *ABX-P*,

$^2J = 11$, $^3J(5'\text{eq},6') = 4.2$, $^3J(5'\text{eq},\text{P}) = 23$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5')$); 3.94 (*dt*, $^3J(1',10'\text{ax}) \approx ^3J(1',6') \approx 11$, $^3J(1',10'\text{eq}) = 4.5$, $\text{H-C}(1')$); 3.87 (*B* von *ABX-P*, $^2J \approx ^3J(5'\text{ax},6') \approx 11$, $^3J(5'\text{ax},\text{P}) \approx 0$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5')$); 1.6 – 2.1 (*br. m*, $\text{H-C}(6')$), (*X* von *ABX-P*), $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(7')$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(8')$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(9')$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(10')$); 3.80 (*s*, H_3CO); 1.50 (*d'q'*, $^2J \approx ^3J(10'\text{ax},1') \approx ^3J(10'\text{ax},9'\text{ax}) \approx 11$, $^3J(10'\text{ax},9'\text{eq}) \approx 4$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(10')$); 1.26 (*br. m*, *t*-ähnlich, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(8')$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(9')$); 0.88 (*br. m*, *q*-ähnlich, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(7')$).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): 169.5 ($\text{C}(1)$); 155.7 (OCON); 136.0 (arom. C); 128.0, 128.1, 128.4 (arom. CH); 83.1, 83.2 (*d*, $^2J(1',\text{P}) = 6.6$, $\text{C}(1')$); 72.8 (*d*, $^3J(5',\text{P}) = 6.0$, $\text{C}(5')$); 67.1 (benzyl C); 66.5, 66.6 (*d*, $^2J(3,\text{P}) = 5.1$, 4.9, $\text{C}(3)$); 54.5 (*d*, $^3J(2,\text{P}) = 6.7$, $\text{C}(2)$); 52.8 (CH_3O); 40.7 (*d*, $^3J(6',\text{P}) = 5.9$, $\text{C}(6')$); 32.3 (*d*, $^3J(10',\text{P}) = 9.0$, $\text{C}(10')$); 25.1 ($\text{C}(7')$); 24.2 ($\text{C}(8')$); 23.8 ($\text{C}(9')$).

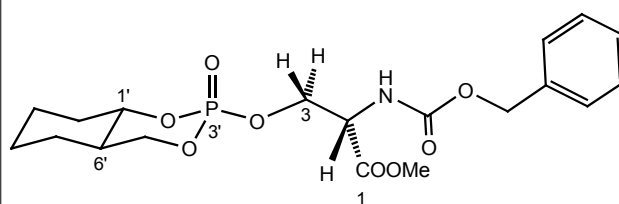
^{31}P -NMR (121.4 MHz, CDCl_3): -7.0 (*dt*, $^3J(\text{P},\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5')) = 23$, $^3J(\text{P},\text{H}_2\text{C}(3)) = 6$).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (161.9 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}/0.2\text{M Tris}$ (pH 7.8) 11:44:45): -5.7 (*s*).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (202.4 MHz, 6 M Guanidin- d_5 - $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02): -4.77 (*s*, $w_{1/2} \approx 12$).

7.8.6 *trans*-(1'*RS*,3'*SR*6'*SR*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-*O*-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phosphabicyclo[4.4.0]dec-3'-yl)-*L*-serin Methylester

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NO}_8\text{P}$ (427.4)



21eq

Erscheinungsbild: farbloses, viskoses Öl.

DC: $R_f(\text{CHCl}_3/\text{AcOEt } 1:1) = 0.16$.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.31 – 7.37 (*m*, 5 arom. H); 5.73 (*br. s*, $\text{HN-C}(2)$); 5.13 (*s*, Benzyl CH_2); 4.33 – 4.62 (*ABC* von *ABC-P*, nicht aufgelöst, $\text{H-C}(2)$, $\text{H}_2\text{C}(3)$); 4.07

– 4.28 (*AB* von *ABX-P*, nicht aufgelöst, und *m*, H_{ax}-C(5'), H_{eq}-C(5'), H-C(1')); 3.79 (*s*, H₃CO); 2.12 (*m*, *X* von *ABX-P*, $w_{1/2} \approx 20$, H-C(6')); 2.0 – 1.6 (*br. m*, 5H, H_{eq}-C(7'), H_{eq}-C(8'), H_{eq}-C(9'), H_{eq}-C(10')); 1.45 (*br. m*, *q*-ähnl., H_{ax}-C(10')); 1.27 (*br. m*, *t*-ähnl., H_{ax}-C(8'), H_{ax}-C(9')); 0.94 (*br. m*, *q*-ähnl., H_{ax}-C(7')).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 169.1 (C(1)); 155.7 (OCON); 136.0 (arom. C); 128.0, 128.1, 128.4 (arom. CH); 82.1 (*d*, $^2J(1',P) = 5.5$, C(1')); 72.2 (*d*, $^3J(5',P) = 5.6$, C(5')); 67.87, 67.92 (*d*, $^2J(3,P) = 5.5, 6.0$, C(3)); 54.3 (*d*, $^3J(2,P) = 6.7$, C(2)); 67.1 (Benzyl C); 52.8 (CH₃O); 40.76, 40.81 (*d*, $^3J(6',P) = 6.3, 6.7$, C(6')); 32.6 (*d*, $^3J(10',P) = 8.2$, C(10')); 25.6 (C(7')); 24.2 (C(8')); 23.8 (*d*, $^4J(9',P) = 2.1$, C(9')).

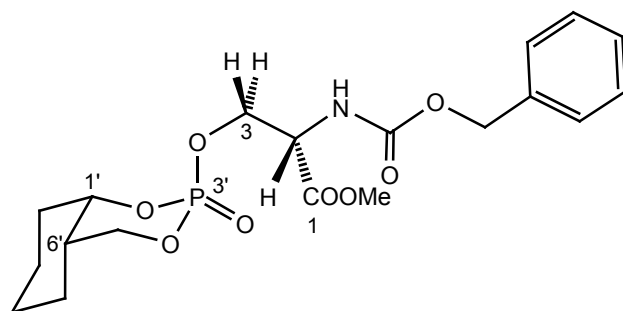
³¹P-NMR (121.4 MHz, CDCl₃): – 4.3 (*m*, $w_{1/2} \approx 36$).

³¹P{¹H}-NMR (161.9 MHz, CD₃CN/D₂O/0.2M *Tris* (pH 7.8) 11:44:45): – 4.5 (*s*).

³¹P{¹H}-NMR (202.4 MHz, 6 M Guanidin-d₅·DCl/D₂O, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02): – 3.95 (*s*, $w_{1/2} \approx 12$).

7.8.7 *cis*-(1'*RS*,3'*RS*,6'*RS*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-O-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phosphabicyclo[4.4.0]dec-3'-yl)-L-serin Methylester

C₁₉H₂₃D₃NO₈P (427.4)



22ax

Die Synthese der *cis*-Modellverbindungen (**22ax** und **22eq**) wurde von FUREGATI anlässlich seiner Diplomarbeit [62],[63] durchgeführt.

Die Verbindungen wurden benötigt, um ³¹P-NMR Spektren in D₂O (6 M Guanidin-d₅·DCl/D₂O, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02) aufzunehmen. Die übrigen experimentellen Daten wurden nur der Vollständigkeit halber noch zusätzlich aufgeführt.

Erscheinungsbild: farbloses, viskoses Öl.

DC: $R_f(\text{AcOEt}) = 0.48$.

IR (CHCl_3): 3430_w, 3000_w, 2940_m, 2860_w, 1723_s, 1513_m, 1450_w, 1436_w, 1342_w, 1295_s, 1155_w, 1111_w, 1083_m, 1064_m, 1002_s, 978_m, 952_m, 926_w, 914_w, 620_w.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 7.31 – 7.37, (*m*, 5 arom. H); 5.83 (*d*, $^3J(\text{NH},2) = 7.7$, NH-C(2)); 5.13 (*s*, PhCH_2); 4.61 (*br. s*, $w_{1/2} \approx 12$, H-C(1'), H-C(2)); 4.35-4.52 (*AB* von *ABX-P*, nicht aufgelöst, $\text{CH}_2(3)$); 4.27 (*dd*, $^2J = 11.2$, $^3J(5'\text{ax},6') = 1.1$, $^3J(5'\text{ax},\text{P}) \approx 0$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5')$); 4.01 (*dd*, $^2J = 11.2$, $^3J(5'\text{eq},\text{P}) = 24$, $^3J(5'\text{eq},6') \approx 0$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5')$); 1.75 – 2.00 (*m*, *d*- and *t*-ähnl., 3H); 3.80 (*s*, MeO); 1.42 – 1.75 (*m*, 4H); 1.28 (*m*, *q*-ähnl., $w_{1/2} \approx 30$, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 169.5 (C(1)); 155.7 (OCON); 136.0 (arom. C); 128.1, 128.2, 128.4 (arom. CH); 79.0, (*d*, $^2J(1',\text{P}) = 6.9$, C(1')); 73.3 (*d*, $^2J(5',\text{P}) = 7.1$, C(5')); 67.1 (PhCH_2); 66.6 (*d*, $^2J(3,\text{P}) = 5.2$, C(3)); 54.4 (*d*, $^3J(2,\text{P}) = 6.7$, C(2)); 52.8 (MeO); 36.1 (*d*, $^3J(6',\text{P}) = 5.6$, C(6')); 31.3 (*d*, $^3J(10',\text{P}) = 8.8$, C(10')); 24.6 (C(7')); 22.9 (C(8')); 18.6 (C(9')).

$^{31}\text{P-NMR}$ (121.4 MHz, CDCl_3): – 7.5 (*d*, $^3J(\text{P},\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5')) = 24$).

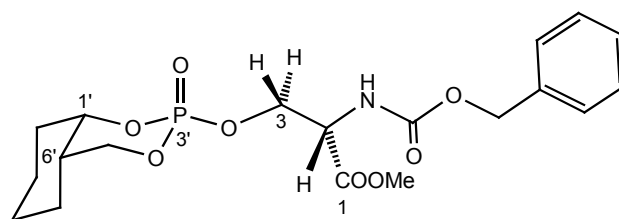
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (242.9 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}/0.2\text{M Tris}$ (pH 7.8) 11:44:45): – 5.67 (*s*).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (202.4 MHz, 6 M Guanidin- $\text{d}_5\cdot\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02): – 4.88 (*s*-ähnl., $w_{1/2} \approx 12$).

ESI-MS ($\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{NaI}$): 450 (100, $[M + \text{Na}]^+$).

7.8.8 *cis*-(1'*RS*,3'*SR*,6'*RS*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-*O*-(3'-oxo-2',4'-dioxo-3'-phosphabicyclo[4.4.0]dec-3'-yl)-*L*-serin Methylester

C₁₉H₂₃D₃NO₈P (427.4)



22eq

Erscheinungsbild: farbloses, viskoses Öl.

DC: R_f (AcOEt) = 0.23.

IR (CHCl₃): 3425_w, 3000_w, 2940_m, 2860_w, 1722_s, 1511_m, 1452_w, 1437_w, 1381_w, 1342_m, 1152_w, 1085_m, 1060_s, 1000_s, 979_m, 961_w, 944_m, 914_w, 620_w.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.31 – 7.37, (*m*, 5 arom. H); 5.82 (*d*, ³*J*(NH,2) = 7.8, NH-C(2)); 5.13 (*s*, PhCH₂); 4.80 (*m*, *quint.*-ähnl., $w_{1/2} \approx 12$, H-C(1')); 4.37 – 4.62 (*m* und *ABX* von *ABX-P*, nicht aufgelöst, H_{ax}-C(5'), H₂C-(3), H-C(2)); 4.12 (*ddd*, ²*J* = 11.3, ³*J*(5'_{eq},P) = 18, ³*J*(5'_{eq},6') = 3.0, H_{eq}-C(5')); 1.18 – 2.04 (*m*, 9H); 3.78 (*s*, MeO).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 169.1 (C(1)); 155.7 (OCON); 136.0 (arom. C); 128.0, 128.1, 128.4 (arom. CH); 78.3 (*d*, ²*J*(1',P) = 5.5, C(1')); 71.6 (*d*, ²*J*(5',P) = 5.4, C(5')); 67.9 (*d*, ²*J*(3,P) = 5.7, C(3)); 67.1 (PhCH₂); 54.3 (*d*, ³*J*(2,P) = 7.3, C(2)); 52.8 (MeO); 35.9 (*d*, ³*J*(6',P) = 5.0, C(6')); 30.5 (*d*, ³*J*(10',P) = 7.0, C(10')); 24.0 (C(7')); 23.8 (C(8')); 19.9 (C(9')).

³¹P-NMR (121.4 MHz, CDCl₃): – 4.9 (*m*, $w_{1/2} \approx 35$).

³¹P{¹H}-NMR (242.9 MHz, CD₃CN/D₂O/0.2M *Tris* (pH 7.8) 11:44:45): – 4.02 (*s*).

³¹P{¹H}-NMR (202.4 MHz, 6 M Guanidin-d₅·DCl/D₂O, 50 mM NaOAc, pH = 4.00 ± 0.02): – 3.67, – 3.88 (beide *s*-ähnl., $w_{1/2} \approx 12$).

ESI-MS (MeOH/CHCl₃/NaI): 450 (100, [M + Na]⁺).

8. ENZYMKINETIK

8.1 Enzymkinetik-assay

Phosphatpuffer pH = 7,00; 100 mM Phosphat; 100 mM NaCl, 10 ppm Pluronic F68:
4.45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1.46 g NaCl und 25 mg Pluronic F-68 wurden im Masskolben mit Wasser (FLUKA 95304, HPLC-Qualität) auf 250 ml aufgefüllt.

6.90 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.92 g NaCl und 50 mg Pluronic F-68 wurden im Masskolben mit Wasser (FLUKA 95304, HPLC-Qualität) auf 500 ml aufgefüllt.

Die beiden Lösungen wurden so gemischt, dass der pH-Wert 7.00 ± 0.02 (pH-Meter) betrug.

Der Phosphatpuffer wurde vor dem Gebrauch filtriert (Spritzenfilter (TITAN): $\varnothing = 30$ mm, Filtrationsvolumen < 150 ml, Filtrationsverlust $< 139 \mu\text{l}$, maximaler Arbeitsdruck 90 Psi, PES-Membran, Porengrösse = $0,2 \mu\text{m}$) um allfällige Mikroben zu entfernen.

AChE-Stammlsg.: 1 mg *EeAChE* (SIGMA C-2888, Typ V-S, lyophilisiertes Pulver ≥ 1000 units/mg Protein, *lots* 103K7651, 39H7402, 129F8080, 228F8040) wurde in 1 ml Phosphatpuffer gelöst. Die Lösung wurde vor dem Gebrauch gut durchmischt. Aufbewahrt wurde sie im Kühlschrank bei 5°C .

AChE-assay-Lsg.: Zu 5 ml Phosphatpuffer wurden $5 \mu\text{l}$ AChE-Stammlsg. gegeben. 1 ml davon wurde in 9 ml Phosphatpuffer verdünnt. Diese Menge reichte jeweils für die K_m -Messung und einen *assay*. Die Lösung wurde vor dem Gebrauch gut durchmischt.

ATC-Lsg.: 22.6 mg Acetylthiocholin (Substrat) wurden in 1 ml Phosphatpuffer gelöst (78 mM). Die Lösung wurde vor dem Gebrauch gut durchmischt. Die Lösung wurde jeden Tag frisch hergestellt und im Eisbad aufbewahrt.

DTNB-Lsg.: 15.0 mg 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure-3,3'-6) wurden in 2 ml Phosphatpuffer gelöst (19 mM). Die Lösung wurde jeden Tag frisch hergestellt und

vor dem Gebrauch gut durchmischt.

Typische Inhibitor-Lsg.: 3.5 mg (18.0 μmol) des jeweiligen Organophosphates wurden in 200 μl abs. MeCN gelöst (90 mM). Mit dieser Inhibitorlösung wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Man erhielt so fünf unterschiedlich konzentrierte *assay*-Inhibitorlösungen in MeCN. Das Totalvolumen der fünf *assay*-Inhibitorlösungen betrug stets 25 μl .

Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante K_m wurde vor jeder enzymkinetischen Messung bei den gleichen Bedingungen wie später beim *assay* (natürlich in Abwesenheit des Inhibitors, dafür mit zusätzlichen 25 μl MeCN⁵⁶) neu bestimmt: Bei fünf verschiedenen Substratkonzentrationen $[S] = [\text{ATC}]$ von 100 μM bis 500 μM wurde die lineare Zunahme des sich bildenden chromogenen Produktes bei 410 – 414 nm photometrisch beobachtet und die fünf resultierenden *steady state* Geschwindigkeiten ($\text{Au}\cdot\text{s}^{-1}$) aus den Geradensteigungen abgelesen. Diese *steady state* Geschwindigkeiten wurden anschliessend gegen die verschiedenen $[S]$ aufgetragen und durch Anpassung der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung an die *steady state* Geschwindigkeiten mittels nicht-linearer Regression, K_m berechnet.

Assay: In einer 4 ml Polystyrolküvette ($d = 1\text{ cm}$) wurden 2.0 ml Phosphatpuffer (pH = 7.00), 100 μl DTNB-Lsg und 20 μl ATC-Lsg 5 min auf 25°C thermostatisiert. Danach gab man 25 μl *assay*-Inhibitor-Lsg. einer bestimmten Konzentration zu. Bei $t = 0$ wurde 1.0 ml AChE-*assay*-Lsg. zugegeben und während 20 s gemischt. Bei $t = 20\text{ s}$ startete die Messung (Wellenlängenbereich 410 – 414 nm) automatisch und dauerte 600 s, wobei jede Sekunde ein Wert registriert wurde. Das Totalvolumen betrug, wie auch bei den K_m -Messungen, 3.145 ml, die Substratkonzentration $[S] = 502\text{ }\mu\text{M}$. Pro Inhibitor wurden mindestens fünf Messungen bei verschiedenen $[I]$ benötigt, die kleinste Konzentration betrug *ca.* ein Fünftel bis ein Zehntel der grössten Konzentration. Die Auswertung der Verlaufskurven und der Abhängigkeiten λ von $[I]$ ist im Theoretischen Teil im **Kapitel 5.8.3.2** (ab S. 111) beschrieben.

⁵⁶ Das MeCN beeinflusst die Aktivität des Enzyms. Ohne die 25 μl MeCN ist die Enzymaktivität leicht erhöht.

Für die Entscheidung zwischen den Modellen (**Gleichungen 17** und **18**) und den Mechanismen (Abhängigkeit von λ von [I], Gleichungen in **Tabelle 15** und **Tabelle 16**) wurden vor allem statistische Kriterien berücksichtigt⁵⁷. Wenn die Entscheidung zwischen den Modellen anhand der *fittings* mit den **Gleichungen 17** und **18** nicht möglich war und die Abhängigkeiten von λ von [I] keine klaren Aussagen bezüglich des Mechanismus zuließen, wurde ein Mechanismus **1B** angenommen und mit der **Gleichung 25** "gefittet". In diesen Fällen konnten ³¹P-NMR Experimente jeweils die Instabilität (Hydrolyse und/oder Epimerisierung) der Inhibitoren bestätigen.

8.2 Stabilitätstests mittels ³¹P-NMR Spektroskopie von (+)-8eq

Die ³¹P{¹H}-NMR Spektren wurden bei 161.9 MHz auf einem BRUKER AV2-400 Spektrometer bei 300 K (δ in ppm, J in Hz) aufgenommen.

Lösungsmittel: Lsg. A: Na₂HPO₄·2H₂O (445 mg), NaCl (146 mg), und Pluronic F-68 (2.5 mg) wurden in D₂O (25 ml) gelöst. Lsg. B: NaH₂PO₄·H₂O (690 mg), NaCl (292 mg), und Pluronic F-68 (2.5 mg) wurden in D₂O (50 ml) gelöst. Die Lösungen wurden durch Mischen auf pH*⁵⁸ 7.00 ± 0.02 eingestellt.

Die Daten: (+)-*cis*-**IVeq**: $\delta = -13.34$ (d , $^1J(\text{P},\text{F}) = 986$). Epimer ((-)-*cis*-**IVax**): $\delta = -12.95$ (d , $^1J(\text{P},\text{F}) = 1003$). Das Hydrolyseprodukt (2,4-dioxa-3-hydroxy-3-phosphabicyclo[4.4.0]decan 3-oxid) tauchte bei $\delta = -1.98$ ppm (s) auf, und das anorganische Phosphat wurde bei $\delta = +2.11$ (s) detektiert.

⁵⁷ Für weiterführende Informationen zur Fehleranalyse und zu den verwendeten statistischen Tests, siehe [114].

⁵⁸ pH* ist der nominelle pH-Wert der Lsg. in D₂O, welcher mit einem pH-Meter gemessen wurde, welches mit Standardpuffern in H₂O kalibriert wurde; pD \approx pH + 0.4 [140].

9. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-SPEKTROSKOPIE AN INHIBIRTER AChE

9.1 $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren der Modellverbindungen

Zwischen 5 und 10 μmol der Modellverbindungen **d-21ax/eq**, **d-22ax/eq**, **21ax/eq** und **22ax/eq** wurden in 240 μl NMR-LM (Guanidin- $\text{d}_5\cdot\text{DCl}$ (6 M), $\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (50 mM) und POPh_3 (208 μM) in D_2O) gelöst. Als interner Standard diene POPh_3 , welcher auf 85 % H_3PO_4 als externer Standard geeicht wurde. Am pH-Meter wurde der pH-Wert der Lösung mit DCl (20 % in D_2O) und NaOD (40% in D_2O) auf *ca.* 4.00 ± 0.02 eingestellt. In einem SHIGEMI-NMR-Röhrchen wurden bei 300 K auf einem BRUKER AV2-500 Spektrometer bei 202.5 MHz die ^{31}P -chemischen Verschiebungen der Modellverbindungen gemessen.

9.2 Probenvorbereitung für die $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektroskopie an phosphorylierter AChE

Pro Inhibitionsversuch wurden jeweils 3.5 bis 7.7 mg *EeAChE* (SIGMA C-2888-5KU⁵⁹, Typ V-S, lyophilisiertes Pulver, lots: 087K7002, 122K7665) eingesetzt. Diese 5000 U AChE wurden in 540 μl 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0, siehe Herstellung des Puffers in **Kapitel 8**) gelöst und in ein 1.5 ml EPPENDORF-Gefäß gegeben.

Die Inhibition wurde bei RT durchgeführt. Die Proben wurden in einem speziellen Glasgefäß am Rotationsverdampfer (ohne Vakuum) ständig gedreht, um die Durchmischung mit Inhibitor zu gewährleisten. Der pH wurde durch Zugabe von wenig 10 % NaOH immer zwischen 7 und 8 gehalten, da die Inhibition bei zu tiefem pH (< 7) nicht mehr stattfindet. Die Restenzymaktivität wurde mittels Enzymkinetik-

⁵⁹ 5000 U AChE entsprechen, nach FUREGATI [2], $8.8\cdot 10^{-8}$ Mol aktiven Stellen pro mg Enzympräparat. Dieser Wert wurde übernommen, da man davon ausgehen kann, dass er sich von Lot zu Lot nur geringfügig verändert. Zudem brauchte man für die Experimente nur eine ungefähre Abschätzung der Anzahl katalytisch aktiven Stellen, um die Menge an internem Standard (POPh_3) zu bestimmen, die dem NMR-Lösungsmittel zugegeben wird.

assay (S. 228) bestimmt. Dazu wurde jeweils 1 µl Enzym-Inhibitor-Gemisch aus der Probe entnommen und mit PP auf 1 ml verdünnt.

Inhibition

(+)-**5ax**: Bei $t = 0$ wurden 3.5 mg Inhibitor, in 14 µl MeCN gelöst, zur *EeAChE*-Lsg. gegeben. Nach 2.5 h war die Enzymaktivität auf *ca.* 20 % gesunken. Es wurden weitere 3.5 mg Inhibitor in 14 µl MeCN zugegeben. Nach 7 h war der pH auf 6.9 gesunken und wurde mit 10 % NaOH auf 7.6 gestellt. Es folgte eine weitere Zugabe von reinen 4.6 mg Inhibitor. Nach 23 h war die Enzymaktivität immer noch bei rund 10 % und der pH war auf 6.6 gesunken. Der pH wurde auf 7.3 gebracht, und weitere 3.6 mg Inhibitor in 15 µl MeCN zugegeben. 2 h danach war die Enzymaktivität noch nicht merklich gesunken. Das war eher ungewöhnlich, und deshalb wurde eine letzte Zugabe von 3 mg reinem Inhibitor gemacht. Mit 18.2 mg Inhibitor war nun eine ungewöhnlich grosse Menge an Inhibitor zugegeben worden. 2 h nach dieser letzten Zugabe war die Enzymaktivität auf 3% gesunken und die Probe konnte weiter verarbeitet werden (siehe unten).

(-)-**7ax**: Bei $t = 0$ wurden in 14 µl MeCN 1.4 mg Inhibitor zur Enzymlösung gegeben und für 1 h inkubiert. Die Restenzymaktivität betrug nach dieser kurzen Zeit < 2% und die Probe konnte weiter verarbeitet werden (siehe unten).

(+)-**7ax**: Bei $t = 0$ wurden in 14 µl MeCN 1.8 mg Inhibitor zur Enzymlösung gegeben. Nach 2 h Stunden zeigte das Enzym kaum noch Aktivität. Trotzdem wurden nochmals 1.8 mg Inhibitor in 14 µl MeCN zugegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Danach wurde die Probe weiter verarbeitet (siehe unten).

(+)-**7eq**: Bei $t = 0$ wurden in 14 µl MeCN 2.0 mg Inhibitor zur Enzymlösung gegeben. Nach 1.5 h war die Enzymaktivität immer noch bei etwa 80 %. Deshalb

wurden in 14 μ l MeCN nochmals weitere 2.6 mg Inhibitor zum Enzym gegeben. Nach weiteren 1.5 h war die Enzymaktivität erst auf 50 % gesunken. Es wurden weitere 6.6 mg Inhibitor in 14 μ l MeCN zugegeben und über Nacht rühren gelassen. Nach 23 h war die Enzymaktivität bei 12 %. Die Probe wurde trotz der mässigen Inhibition weiter verarbeitet (siehe unten).

(+)-**8ax**: Bei $t = 0$ wurden in 14 μ l MeCN 2.4 mg Inhibitor zur Enzymlösung gegeben und für 1 h rühren gelassen. Die Aktivität des Enzyms war nach dieser kurzen Zeit beinahe Null. Die Probe wurde weiter verarbeitet (siehe unten).

Dialyse

Die Proben wurden, wenn nötig, über Watte filtriert, um ungelösten Inhibitor zu entfernen. Anschliessend wurde die Probelösung in einen Dialyseschlauch (SIGMA D-9277) gegeben, welcher zuvor mehrere Stunden mit entionisiertem Wasser gespült worden war, um das Glycerin (Feuchthaltemittel) zu entfernen. Der Schlauch wurde danach in ein 500 ml Becherglas mit Rührmagnet und 250 ml 10 mM TRIS-Puffer, pH \approx 7.7 (0.1 M NaCl, 0.01% Pluronic F-68, entionisiertes Wasser aus dem Hahn) getaucht und die Dialyse unter leichtem Rühren (200 - 300 rpm) bei RT durchgeführt. Dadurch sollten vorallem überschüssiges anorganisches Phosphat und hydrolysierter Inhibitor entfernt werden.

Bei (+)-**5ax** wurde eine "lange" Dialyse durchgeführt, da der Enzym-Inhibitor-Komplex relativ stabil ist. Es wurde 8 mal gegen jeweils 250 ml TRIS-Puffer dialysiert. Die einzelnen Dialyseintervalle, nach denen der TRIS-Puffer ausgetauscht wurde, waren wie folgt: 2 h, 16 h, 2 h, 5 h, 16 h, 2 h, 2 h, 1 h.

Bei den Inhibitoren (–)-**7ax**, (+)-**7ax**, (+)-**7eq** und (+)-**8ax** musste aufgrund der hohen Hydrolyseanfälligkeit der Enzym-Inhibitor-Komplexe eine "kurze" Dialyse durchgeführt werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Dialyse nicht länger als 4 h (4 mal je 1 h) dauerte. Dies führte dazu, dass bei allen carbocyclischen Proben noch anorganisches Phosphat im NMR zu sehen war. Aufgrund seiner chemischen

Verschiebung (+ 0.9 ppm) stört es aber das Experiment nicht.

Die Proben wurden nach der Dialyse über Nacht lyophilisiert und noch am gleichen Tag gemessen.

NMR-Lösungsmittel

Das NMR-Lösungsmittel wurde wie folgt hergestellt [76]: 3 g Guanidin·HCl wurde in 3 ml D₂O gelöst und über Nacht lyophilisiert. Der Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Daraus resultierte Guanidin-d₅·DCl. In 2 ml D₂O wurden anschliessend 2.19 g Guanidin-d₅·DCl (6 M), 24.5 mg NaOAc·3H₂O (50 mM) und 210 µg POPh₃ ($5 \cdot 10^{-8}$ Mol pro 240 µl, ist im Bereich der Menge an katalytisch aktiven Stellen ($8.8 \cdot 10^{-8}$ mol/mg Enzympräparat [2]), $\delta = 37.1$ ppm) gelöst.

NMR-Messungen

Die Proben wurden nach dem Gefriertrocknen in 240 µl NMR-Lösungsmittel gelöst und der pH*⁵⁸ mit DCl (20 % in D₂O) und NaOD (40% in D₂O) auf *ca.* 4.00 ± 0.02 eingestellt. Unter diesen Bedingungen denaturiert das Enzym vollständig, was für die Detektion eines ³¹P-NMR Signals des gebundenen Inhibitors unerlässlich ist. Die Lösung wurde in ein SHIGEMI-NMR-Röhrchen übergeführt. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen in der Lösung zurückblieben.

Die ³¹P{¹H}-NMR Spektren wurden bei 300 K auf einem BRUKER AV2-500 Spektrometer bei 202.5 MHz aufgenommen. Um möglichst intensive Signale zu erhalten wurden zwischen 100'000 und 200'000 *scans* durchgeführt und die Spektren mit einem *line broadening* Faktor von 10 fouriertransformiert.

10. APPENDIX

10.1 Apparatur für die POFCl_2 Synthese

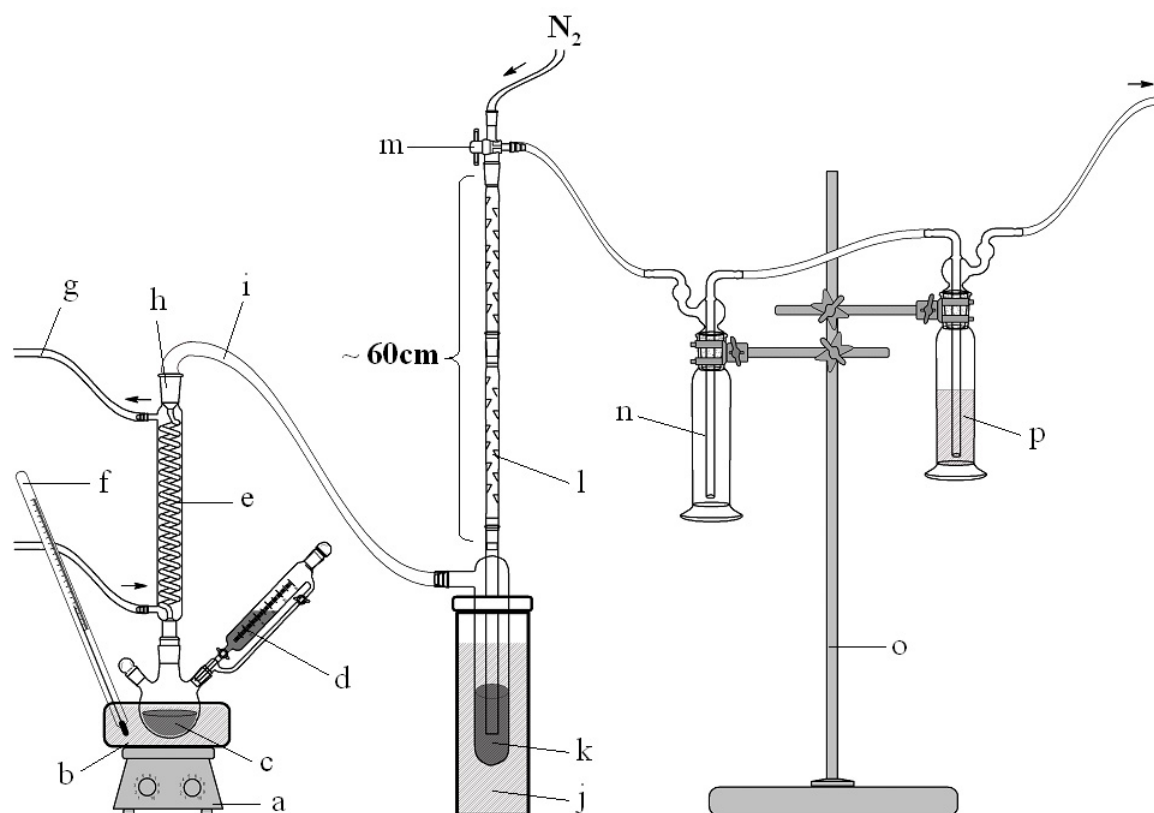


Abbildung 57: a) Magnetrührer mit Heizplatte, b) Kälte- bzw. Wärmebad, c) 500 ml Dreihalsrundkolben mit zerriebenem NH_4F , d) Tropftrichter mit POCl_3 , e) Intensivkühler, f) Thermometer, g) Kühlwasser, h) Alle Verbindungsstücke mit Teflonband abgedichtet, i) Teflonschlauch (Alle Schläuche mit möglichem Kontakt zu den fluorierten Verbindungen sind aus Teflon), k) Kühlfalle mit kondensierten Phosphoryl Fluoriden (POF_xCl_3), j) Dewar mit Aceton-Trockeneis Gemisch (-78°C), l) ca. 60cm lange Vigreux-Kolonne, m) Hahn für Stickstoffzufuhr, n) Waschflasche (leer), o) Stativ mit Klammern, p) Waschflasche mit 0.1 M NaOH.

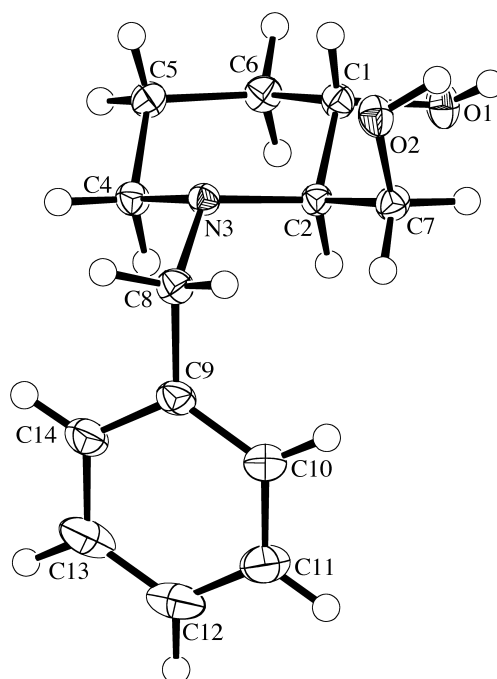
10.2 Kristallographische Daten der *N*-benzylierten Verbindungen

10.2.1 Daten der *N*-benzylierten Diole

Die Daten wurden unübersetzt aus den Berichten von LINDEN übernommen (siehe **Tabelle 22**, S. 238). Es wurde darauf verzichtet, die kristallographischen Daten der Diole (+)-**4** und (+)-**3** anzugeben, da diese in jeder Hinsicht identisch sind mit den Daten von (–)-**3** und (–)-**4**.

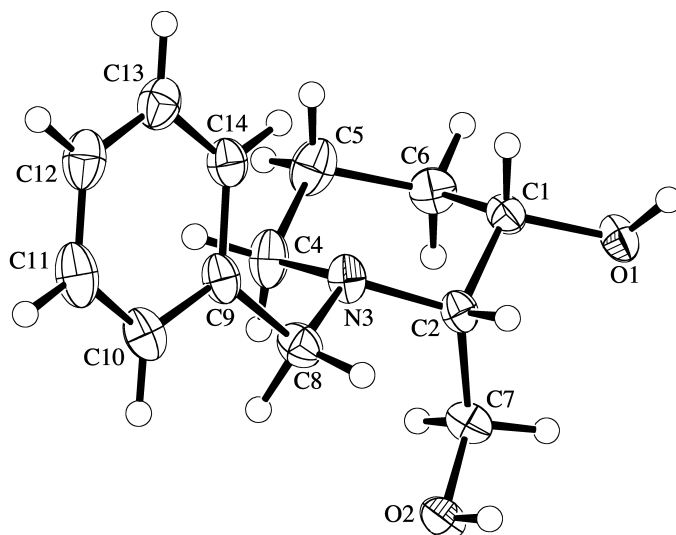
(–)-**3**

The structure of $C_{13}H_{19}NO_2$ ((–)-**3**) has been solved and refined successfully with no unusual features. The space group permits the compound in the crystal to be enantiomerically pure, but the absolute configuration of the molecule has not been determined. The enantiomer used in the refinement was based on the assumed configuration of the six-membered ring. Based on this assumption, the hydroxy substituted C-atom has the S-configuration, while the hydroxymethyl substituted C-atom has the R-configuration. The substituents lie trans to one another with the hydroxy and hydroxymethyl substituents in equatorial positions. Intermolecular hydrogen bonds link the molecules into extended chains.



(-)-4

The structure of $C_{13}H_{19}NO_2$ ((-)-4)) has been solved and refined successfully with no unusual features. The space group permits the compound in the crystal to be enantiomerically pure, but the absolute configuration of the molecule has not been determined. The enantiomer used in the refinement was based on the assumed configuration of the six-membered ring. Based on this assumption both substituted ring C-atoms have the *S*-configuration. The substituents lie *cis* to one another with the hydroxy substituent in an equatorial position and the hydroxymethyl substituent in an axial orientation. Intermolecular hydrogen bonds link the molecules into two-dimensional networks.



	(-)- 3	(-)- 4
Crystallised from	Et ₂ O / hexane	Et ₂ O / hexane
Empirical formula	C ₁₃ H ₁₉ NO ₂	C ₁₃ H ₁₉ NO ₂
Formula weight [g mol ⁻¹]	221.30	221.30
Crystal colour, habit	colourless, prism	colourless, prism
Crystal dimensions [mm]	0.28 × 0.32 × 0.35	0.23 × 0.30 × 0.30
Temperature [K]	160(1)	160(1)
Crystal system	orthorhombic	monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (#19)	<i>P</i> 2 ₁ (#4)
<i>Z</i>	4	2
Reflections for cell determination	2057	1545
2 θ range for cell determination [°]	4 – 60	2 – 55
Unit cell parameters		
<i>a</i> [Å]	6.6996(2)	6.0859(3)
<i>b</i> [Å]	7.4619(2)	7.4213(3)
<i>c</i> [Å]	24.0697(5)	13.8242(6)
α [°]	90	90
β [°]	90	91.565(3)
γ [°]	90	90
<i>V</i> [Å ³]	1203.29(5)	624.14(5)
<i>F</i> (000)	480	240
<i>D_x</i> [g cm ⁻³]	1.221	1.177
μ (Mo <i>K</i> α) [mm ⁻¹]	0.0817	0.0787
Scan type	ϕ and ω	ϕ and ω
2 θ_{max} [°]	60	55
Total reflections measured	18063	14039
Symmetryindependent reflections	2039	1541
<i>R</i> _{int}	0.052	0.056
Reflections with <i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)	1920	1337
Reflections used in refinement	2039	1541
Parameters refined	154	154; 1
Final <i>R</i> (<i>F</i>) [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>) reflections]	0.0385	0.0459
<i>wR</i> (<i>F</i> ²) (all data)	0.0998	0.1069
Weights:	$w = [\sigma^2(F_o^2) + (0.0758P)^2 + 1.1992P]^{-1}$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	
Goodness of fit	1.070	1.144
Secondary extinction coefficient	0.35(2)	0.41(3)
Final Δ_{max}/s	0.001	0.001
$\Delta\rho$ (max; min) [e Å ⁻³]	0.33; -0.23	0.27; -0.22
$\sigma(d_{\text{C-C}})$ [Å]	0.002 – 0.003	0.003 – 0.004

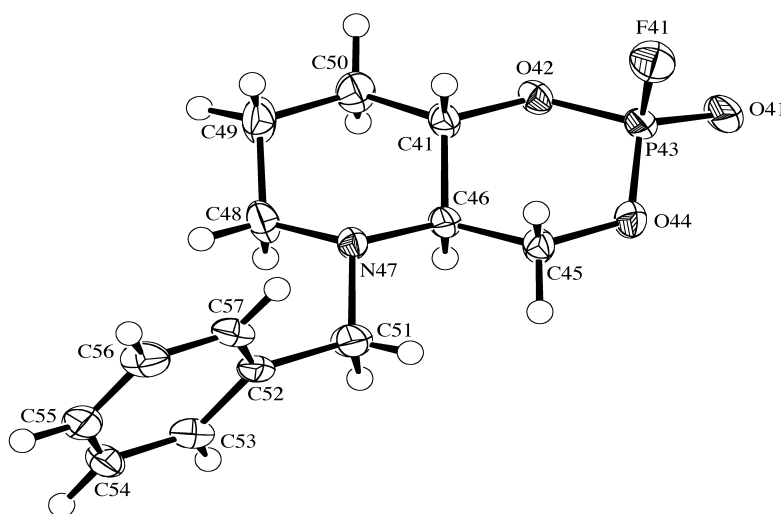
Tabelle 22: Kristallographische Daten der N-benzylierten Diole.

10.2.2 Daten der *N*-benzylierten ACh-Mimetika

Die Daten wurden unübersetzt aus den Berichten von LINDEN übernommen (siehe **Tabelle 23**, S. 241). Es wurde auch hier darauf verzichtet, die kristallographischen Daten der jeweiligen enantiomeren ACh-Mimetika ((+)-**5ax** und (–)-**6ax**) anzugeben, da die Daten, den FLACK Parameter ausgenommen, mit denen von (–)-**5ax** und (+)-**6ax** identisch sind.

(–)-**5ax**

The structure of $C_{13}H_{17}FNO_3P$ ((–)-**5ax**) has been solved and refined successfully. The compound in the crystal is enantiomerically pure and the absolute configuration of the molecule has been determined independently by the diffraction experiment. The molecule has the expected 1*S*,3*S*,6*R* configuration. There are three symmetry-independent molecules of the same enantiomer in the asymmetric unit.

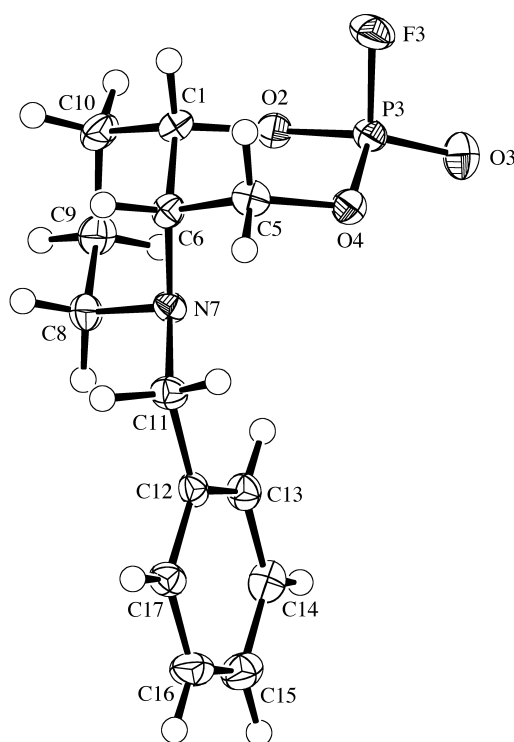


Absolute Structure Parameter

Refinement of the absolute structure parameter [141][142] yielded a value of **-0.05(8)**, which confidently confirms that the refined model corresponds with the true enantiomorph.

(+)-**6ax**

The structure of $C_{13}H_{17}FNO_3P$ ((+)-**6ax**) has been solved and refined successfully with no unusual features. The earlier difficulty with the quality of the results has been overcome with this determination. The compound in the crystal is enantiomerically pure and the absolute configuration of the molecule has been determined independently by the diffraction experiment. The molecule has the expected 1*S*,3*S*,6*S*-configuration.



Absolute Structure Parameter

Refinement of the absolute structure parameter [141][142] yielded a value of **0.02(8)**, which confidently confirms that the refined model corresponds with the true enantiomorph.

	(-)- 5ax	(+)- 6ax
Crystallised from	Et ₂ O	pentane / Et ₂ O
Empirical formula	C ₁₃ H ₁₇ FNO ₃ P	C ₁₃ H ₁₇ FNO ₃ P
Formula weight [g mol ⁻¹]	285.25	285.25
Crystal colour, habit	colourless, prism	colourless, prism
Crystal dimensions [mm]	0.25 × 0.35 × 0.35	0.15 × 0.22 × 0.25
Temperature [K]	160(1)	160(1)
Crystal system	orthorhombic	orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (#19)	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (#19)
<i>Z</i>	12	4
Reflections for cell determination	66907	14905
2 θ range for cell determination [°]	4 – 56	4 – 60
Unit cell parameters		
<i>a</i> [Å]	13.5669(2)	9.7745(2)
<i>b</i> [Å]	15.5403(2)	10.0774(2)
<i>c</i> [Å]	19.7914(3)	13.5432(2)
α [°]	90	90
β [°]	90	90
γ [°]	90	90
<i>V</i> [Å ³]	4172.7(1)	1334.03(4)
<i>F</i> (000)	1800	600
<i>D_x</i> [g cm ⁻³]	1.362	1.420
μ (Mo <i>K</i> α) [mm ⁻¹]	0.212	0.221
Scan type	ω	ϕ and ω
2 θ_{max} [°]	56	60
Transmission factors (min; max)	0.812; 0.951	0.854; 0.970
Total reflections measured	62660	24752
Symmetryindependent reflections	9854	3878
<i>R</i> _{int}	0.082	0.063
Reflections with <i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)	8055	3449
Reflections used in refinement	9854	3878
Parameters refined	515	173
Final <i>R</i> (<i>F</i>) [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>) reflections]	0.0541	0.0383
<i>wR</i> (<i>F</i> ²) (all data)	0.1346	0.0958
Weights:	$w = [\sigma^2(F_o^2) + (0.0758P)^2 + 1.1992P]^{-1}$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	
Goodness of fit	1.079	1.068
Secondary extinction coefficient	0.0107(9)	0.020(2)
Final $\Delta_{\text{max/s}}$	0.001	0.001
$\Delta\rho$ (max; min) [e Å ⁻³]	0.59; -0.56	0.34; -0.30
$\sigma(d_{\text{C-C}})$ [Å]	0.003 – 0.005	0.002 – 0.003
P-F [Å]	1.544(2)	1.552(1)
P=O [Å]	1.443(2)	1.452(1)

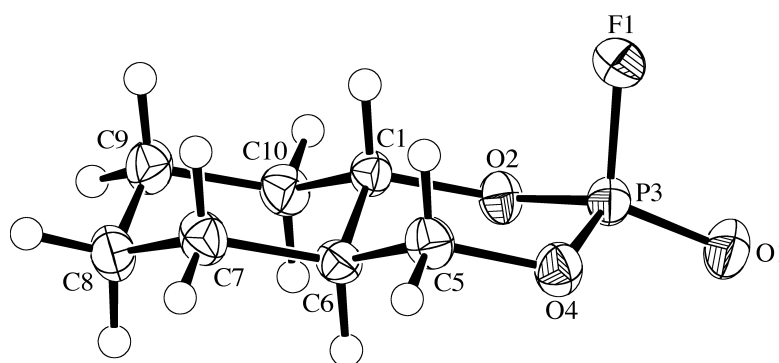
Tabelle 23: Kristallographische Daten der optisch aktiven N-benzylierten ACh-Mimetika.

10.3 Kristallographische Daten der carbocyclischen Organophosphate

Die Daten wurden unübersetzt aus den Berichten von LINDEN übernommen (siehe *Tabelle 24*, S. 245). Es wurde darauf verzichtet, die kristallographischen Daten der jeweiligen enantiomeren Organophosphate ((+)-**7ax**, (+)-**7eq** und (-)-**8eq**) anzugeben, da die Daten, den FLACK Parameter ausgenommen, mit denen von (-)-**7ax**, (-)-**7eq** und (-)-**8eq** identisch sind.

(-)-**7ax**

The structure of $C_7H_{12}FO_3P$ ((-)-**7ax**) has been solved and refined successfully with no unusual features. The compound in the crystal is enantiomerically pure and the absolute configuration of the molecule has been determined independently by the diffraction experiment. The molecule has the expected 1*S*,3*S*,6*R*-configuration. The six-membered ring containing the P-atom has an undistorted chair conformation with the F-atom in the axial position. Note that in both this structure and that of (-)-**7eq** (**RU0503**), the P–F and P=O bonds are axial and equatorial, respectively, even though the P-atom in (-)-**7eq** has the opposite configuration. Obviously, the O-atom always prefers to be in the equatorial position and this is achieved in the two isomers through different conformations of the six-membered ring containing the P-atom. A similar characteristic was observed in the related structures **RU9905** & **RU9906**.

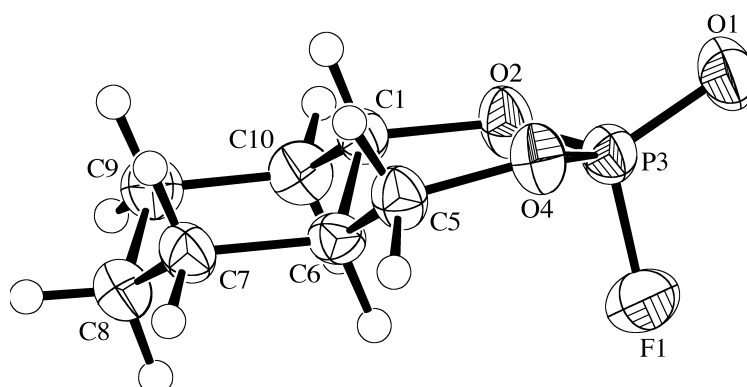


Absolute Structure Parameter

Refinement of the absolute structure parameter [141], [142] yielded a value of **-0.1(1)**, which confidently confirms that the refined coordinates represent the true enantiomorph.

(-)-**7eq**

The structure of $C_7H_{12}FO_3P$ ((-)-**7eq**) has been solved and refined successfully with no unusual features. The compound in the crystal is enantiomerically pure and the absolute configuration of the molecule has been determined independently by the diffraction experiment. The molecule has the expected 1*S*,3*R*,6*R*-configuration. The six-membered ring containing the P-atom has a distorted screw-boat conformation with the F-atom in the axial position. Note that in both this structure and that of (-)-**7ax** (**RU0502**), the P–F and P=O bonds are axial and equatorial, respectively, even though the P-atom in (-)-**7ax** has the opposite configuration. Obviously, the O-atom always prefers to be in the equatorial position and this is achieved in the two isomers through different conformations of the six-membered ring containing the P-atom. A similar characteristic was observed in the related structures **RU9905** & **RU9906**.

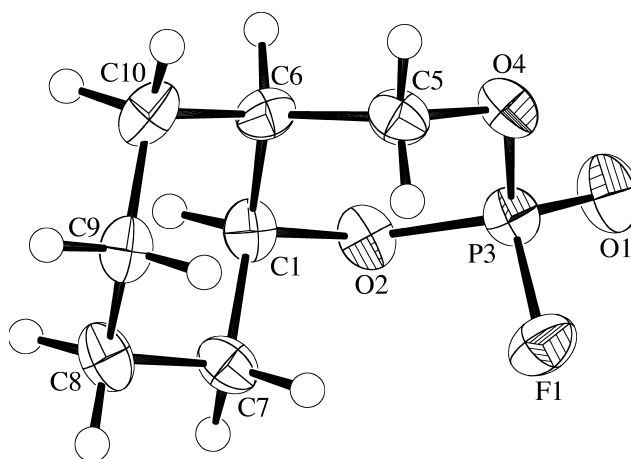


Absolute Structure Parameter

Refinement of the absolute structure parameter [141][142] yielded a value of **0.0(1)**, which confidently confirms that the refined coordinates represent the true enantiomorph.

(-)-8eq

The structure of $C_7H_{12}FO_3P$ ((-)-8eq) has been solved and refined successfully with no unusual features. The *cis*-decalin compound in the crystal is enantiomerically pure and the absolute configuration of the molecule has been determined independently by the diffraction experiment. The molecule has the expected 1*S*,3*R*,6*S*-configuration. There is no evidence of epimerisation of this compound. The six-membered rings have chair conformations, but the chair conformations have flipped in order to bring the F-atom into the preferred axial position.



Absolute Structure Parameter

Refinement of the absolute structure parameter [141][142] yielded a value of **0.0(1)**, which confidently confirms that the refined coordinates represent the true enantiomorph.

	(–)- 7ax	(–)- 7eq	(–)- 8eq
Crystallised from	Et ₂ O	Et ₂ O	Et ₂ O / hexane
Empirical formula	C ₇ H ₁₂ FO ₃ P	C ₇ H ₁₂ FO ₃ P	C ₇ H ₁₂ FO ₃ P
Formula weight [g mol ⁻¹]	194.14	194.14	194.14
Crystal colour, habit	colourless, prism	colourless, plate	colourless, tablet
Crystal dimensions [mm]	0.12×0.20×0.20	0.05×0.22×0.25	0.08×0.15×0.25
Temperature [K]	160(1)	160(1)	160(1)
Crystal system	orthorhombic	monoclinic	orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (#19)	<i>P</i> 2 ₁ (#4)	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (#19)
<i>Z</i>	4	2	4
Reflections for cell determination	16961	55788	24812
2 θ range for cell determination [°]	4 – 60	4 – 55	4 – 60
Unit cell parameters			
<i>a</i> [Å]	5.4802(1)	6.4112(3)	6.0420(2)
<i>b</i> [Å]	10.6385(3)	9.0098(4)	9.6252(3)
<i>c</i> [Å]	14.5929(3)	7.6547(3)	14.7274(4)
α [°]	90	90	90
β [°]	90	96.617(3)	90
γ [°]	90	90	90
<i>V</i> [Å ³]	850.78(3)	439.22(3)	856.48(5)
<i>F</i> (000)	408	204	408
<i>D_x</i> [g cm ⁻³]	1.516	1.468	1.505
μ (Mo <i>K</i> α) [mm ⁻¹]	0.304	0.294	0.302
Scan type	ϕ and ω	ϕ and ω	ϕ and ω
2 θ_{max} [°]	60	55	60
Transmission factors (min; max)	0.833; 0.966	0.880; 0.987	0.848; 0.981
Total reflections measured	23092	15681	21812
Symmetryindependent reflections	2494	2013	2506
<i>R</i> _{int}	0.058	0.055	0.056
Reflections with <i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)	2193	1774	2198
Reflections used in refinement	2494	2013	2506
Parameters refined	110	110; 1	110
Final <i>R</i> (<i>F</i>) [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>) reflections]	0.0344	0.0369	0.0348
<i>wR</i> (<i>F</i> ²) (all data)	0.0856	0.0902	0.0833
Weights:	$w = [\sigma^2(F_o^2) + (0.0758P)^2 + 1.1992P]^{-1}$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$		
Goodness of fit	1.070	1.087	1.037
Secondary extinction coefficient	0.018(3)	0.036(7)	0.017(4)
Final $\Delta_{\text{max/s}}$	0.001	0.001	0.001
$\Delta\rho$ (max; min) [e Å ⁻³]	0.26; -0.28	0.25; -0.24	0.21; -0.26
$\sigma(d_{\text{C-C}})$ [Å]	0.002 – 0.003	0.003 – 0.004	0.002 – 0.003
P-F [Å]	1.547 (1)	1.548 (2)	1.548 (1)
P=O [Å]	1.447 (1)	1.446 (2)	1.449 (1)

Tabelle 24: Kristallographische Daten der optisch aktiven carbocyclischen Organophosphate.

11. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Wächter, 'Herstellung optisch aktiver Organophosphate mit *cis*- und *trans*-Decalingerüst zur Untersuchung der Inhibition von Acetylcholinesterase', Diplomarbeit, Universität Zürich, 2005.
- [2] S. Furegati, 'Synthese von konformativ definierten Organophosphat-Acetylcholinmimetika zur Untersuchung der Inhibition von Acetylcholinesterase', Dissertation, Universität Zürich, 2002.
- [3] D. M. Quinn, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 955.
- [4] B. B. Hasinoff, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 704, 52.
- [5] H. Soreq, S. Seidman, *Nature Reviews Neuroscience* **2001**, 2, 294.
- [6] M. Hallak, E. Giacobini, *Neuropharmacology* **1989**, 28, 199.
- [7] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, 'Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie', Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 1987.
- [8] M. L. Raves, M. Harel, Y. P. Pang, I. Silman, A. P. Kozikowski, J. L. Sussman, *Nature Structural Biology* **1997**, 4, 57.
- [9] G. Kryger, I. Silman, J. L. Sussman, *Structure* **1999**, 7, 297.
- [10] S. Franke, 'Lehrbuch der Militärchemie', Deutscher Militärverlag, Berlin, 1967, S. 297.
- [11] R. Klimmek, L. Szinicz, N. Weger, 'Chemische Gifte und Kampfstoffe', Hippokrates, 1983.
- [12] I. Stark, *Chemie in unserer Zeit* **1984**, 3, 96.
- [13] J. L. Sussman, I. Silman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, 2, 271.
- [14] P. Taylor, Eds. A. G. Gillman, T. W. Rall, A. Nies, P. Taylor, 'The Pharmacological Basis of Therapeutics', New York, 1990, S. 131.
- [15] F. A. Merckling, P. Rüedi, *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, 2217.
- [16] Y. Segall, D. Waysbort, D. Barak, N. Ariel, B. P. Doctor, J. Grundwald, Y. Ashani, *Biochemistry* **1993**, 32, 13441.

- [17] C. B. Millard, G. Koellner, A. Ordentlich, A. Shafferman, I. Silman, J. L. Sussman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9883.
- [18] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **1991**, *253*, 872.
- [19] M. A. Massiah, C. Viragh, P. M. Reddy, I. M. Kovach, J. Johnson, T. L. Rosenberry, A. S. Mildvan, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5682.
- [20] D. M. Blow, J. J. M. Birktoft, B. S. Hartley, *Nature* **1969**, *221*, 337.
- [21] R. H. Linderman, J. Leazer, R. M. Roe, K. Venkatesh, B. S. Selinsky, R. E. London, *Pesticide Biochemistry and Physiology* **1988**, *31*, 187.
- [22] M. Harel, D. M. Quinn, H. K. Nair, I. Silman, J. L. Sussman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2340.
- [23] Z. Radic, R. Duran, D. C. Vellom, Y. Li, C. Cervenansky, P. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11233.
- [24] Y. Bourne, P. Taylor, Z. Radic, P. Marchot, *EMBO J.* **2003**, *22*, 1.
- [25] J. L. Johnson, B. Cusack, M. P. Davies, A. Fauq, T. L. Rosenberry, *Biochemistry* **2003**, *42*, 5438.
- [26] J. Stojan, L. Brochier, C. Alies, J. P. Colletier, D. Fournier, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1364.
- [27] J. P. Colletier, D. Fournier, H. M. Greenblatt, J. Stojan, J. L. Sussman, G. Zaccai, I. Silman, M. Weik, *EMBO J.* **2006**, *25*, 2746.
- [28] A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, H. P. Benschop, L. P. A. D. Jong, N. Ariel, R. Barak, Y. Segall, B. Velan, A. Shafferman, *Biochemistry*, *38*, 2055.
- [29] W. Heiligenberg, 'Principles of Electrollocation and Jamming Avoidance in Electric Fish', Springer, Berlin, 1977.
- [30] A. L. Val, V. M. F. de Almeida-Val, 'Fishes of the Amazon and their Enviroment', Springer, Berlin, 1995.
- [31] Y. Bourne, J. Grassi, P. E. Bougis, P. Marchot, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30370.
- [32] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, 'Lehrbuch der Biochemie', WILEY-VCH

Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2002, S. 327.

- [33] J. K. Herdtklotz, R. L. Sass, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1970**, *40*, 583.
- [34] C. Chothia, P. Pauling, *Nature* **1968**, *219*, 1156.
- [35] M. Sax, M. Rodrigues, G. Blank, M. K. Wood, J. Pletcher, *Acta Cryst.* **1976**, *32*, 1953.
- [36] C. C. J. Culvenor, N. S. Ham, *Chem. Commun.* **1966**, *15*, 537.
- [37] P. Partington, J. Feeny, A. S. V. Burgen, *Mol. Pharmacol.* **1972**, *8*, 269.
- [38] B. Pullman, P. Courrière, *Molecular Pharmacology* **1972**, *6*, 612.
- [39] D. Ajò, M. Bossa, A. Damiani, R. Fidenzi, S. Gigli. L. Lanzi, A. Lapicciarella, C. Scarponi, *Gazzetta Chimica Italiana* **1973**, *103*, 629.
- [40] D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 98.
- [41] Y. Bourne, Z. Radic, G. Sulzenbacher, E. Kim, P. Taylor, P. Marchot, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29256.
- [42] D. O. Shah, D. Kallik, R. Rowell, R. Chen, D. G. Gorenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6942, und dort zitierte Literatur.
- [43] R. A. Oosterbaan, P. Kunst, J. A. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* **1955**, *16*, 299.
- [44] B. S. Hartley, *Annu. Rev. Biochem.* **1960**, *29*, 45.
- [45] W. N. Aldridge, *Biochem. J.* **1950**, *46*, 451.
- [46] W. N. Aldridge, E. Reiner, 'Enzyme Inhibitors as Substrates : Interaction of Esterases with Esters of Organophosphorus and Carbamic Acids', American Elsevier, New York, 1972.
- [47] R. M. Stroud, L. M. Kay, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **1974**, *83*, 185.
- [48] A. R. Main, *Pharmacol. Ther.* **1979**, *6*, 579.
- [49] N. K. Schaffer, C.S. May, W.H. Summerson, *J. Biol. Chem.* **1953**, *202*, 67.
- [50] R. Wolfenden, *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 10.
- [51] G. E. Lienhard, *Science* **1973**, *180*, 149.
- [52] J. L. Markley, Ed. R. G. Shulman, 'Biological Applications of Magnetic

Resonance', Academic Press, New York, 1979, S. 397.

- [53] H. J. Vogel, Ed. D. G. Gorenstein, 'Phosphorus-31 NMR', Academic Press, Orlando, 1984, S. 105.
- [54] D. G. Gorenstein, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1047.
- [55] D. G. Gorenstein, *Methods Enzymol.* **1989**, 177, 295.
- [56] D. G. Gorenstein, Ed. D. G. Gorenstein, 'Phosphorus-31 NMR', Academic Press, Orlando, 1984, S. 7.
- [57] D. G. Gorenstein, Eds. J. G. Verkade, L. D. Quin, 'Phosphorus-31 NMR Spectroscopy in Stereochemical Analysis', 'Methods in Stereochemical Analysis', Verlag Chemie, Weinheim, 1987, Vol. 8.
- [58] F. A. Merckling, ³¹P-NMR-spektroskopische Untersuchungen der Inhibierung von Acetylcholinesterase mit Organophosphaten', Dissertation, Universität Zürich, 1993.
- [59] G. Przibille, Interne Arbeitsberichte, Universität Zürich, 1991-1996.
- [60] M. J. Stöckli, 'Synthese und Charakterisierung von enantiomerenreinen, deuterierten Phosphadecalinen als Inhibitoren von δ-Chymotrypsin und Etablierung der ³¹P/¹H-NMR-Spektroskopie zur Untersuchung des stereochemischen Verlaufs des Inhibitionsmechanismus', Dissertation, Universität Zürich, 2006.
- [61] W. Ganci, E. J. M. Meier, F. A. Merckling, G. Przibille, U. Ringeisen, P. Rüedi, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 421.
- [62] S. Furegati, 'Herstellung optisch aktiver Organophosphate mit *cis*-Decalingerüst und ³¹P-NMR-spektroskopische Untersuchungen ihrer Wechselwirkungen mit δ-Chymotrypsin', Diplomarbeit, Universität Zürich, 1997.
- [63] S. Furegati, W. Ganci, G. Przibille, P. Rüedi, *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 1127.
- [64] U. Ringeisen, 'Synthese und Charakterisierung von *N*-Heterocyclischen Organophosphaten als Inhibitoren der Acetylcholinesterase', Dissertation,

Universität Zürich, 1996.

- [65] A. Strehler, 'Herstellung von optisch aktiven *N*-heterocyclischen Organophosphaten als Acetylcholinmimetika', Diplomarbeit, Universität Zürich, 1997.
- [66] J. A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543.
- [67] W. Ganci, 'Untersuchungen der Wechselwirkungen von Serinhydrolasen mit Organophosphaten: Synthese kationischer *N*-Heterocyclen und ³¹P-NMR-Spektroskopie von Enzym-Inhibitoraddukten', Dissertation, Universität Zürich, 1998.
- [68] P. H. Axelsen, M. Harel, I. Silman, J. L. Sussman, *Protein Science* **1994**, *3*, 188.
- [69] P. Lorenzetto, 'Enantioselektive Herstellung und Charakterisierung der 3-Hydroxypiperidin-4-carboxylate als Vorläufer von Acetylcholinmimetika', Diplomarbeit, Universität Zürich, 1998.
- [70] P. Lorenzetto, 'Synthese und Charakterisierung der enantiomerenreinen 9-Aza-3-Phosphadecaline als Acetylcholin-Mimetika', Dissertation, Universität Zürich, 2009, eingereicht.
- [71] C. Clerc, 'Synthese und Charakterisierung von enantiomerenreinen *N*-heterocyclischen Phosphadecalinen als Inhibitoren von Acetylcholinesterase', Dissertation, Universität Zürich, 2008.
- [72] M. J. Stöckli, 'Herstellung von deuterierten Organophosphaten mit *trans*-Decalingerüst als Inhibitoren von δ -Chymotrypsin', Diplomarbeit, Universität Zürich, 1999.
- [73] M. J. Stöckli, P. Rüedi, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 106.
- [74] M. J. Stöckli, P. Rüedi, *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 2058.
- [75] S. Furegati, M. Binder, A. Linden, P. Rüedi, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 1351.
- [76] S. Furegati, Interne Arbeitsberichte, Universität Zürich, 2004.
- [77] S. Furegati, O. Zerbe, P. Rüedi, *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *157-158*, 353.

- [78] J.-M. Chemnitus, K.-H. Haselmeyer, R. Zech, *Analytical Biochem.* **1982**, 125, 442.
- [79] A. Hornberg, A.-K. Tunemalm, F. Ekstrom, *Biochemistry* **2007**, 46, 4815.
- [80] G. Kryger, C. B. Millard, I. Silman, J. L. Sussman, *Biochemistry* **1999**, 38, 7032.
- [81] J. R. v. Wazer, L. H. Letcher, ³¹P-NMR', M. M. Crutchfield, C. H. Dungan, L. H. Letcher, V. Mark, J. R. v. Wazer, New York, 1967, S. 75.
- [82] M. Wächter, P. Rüedi, *Chemistry & Biodiversity* **2009**, 6, im Druck.
- [83] V. Prelog, P. Wieland, *Helv. Chim. Acta* **1944**, 27, 1127.
- [84] P. Rüedi, *Schweiz. Lab. Zeitschrift* **1992**, 3, 87.
- [85] C. E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.* **1952**, ?, 3940.
- [86] P. Rüedi, *Pure & Appl. Chem.* **1985**, 57, 793.
- [87] J. W. Dolan, *LC-GC* **1987**, 5, 1030.
- [88] S. Furegati, W. Ganci, F. Gorla, U. Ringeisen, P. Rüedi, *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 2629.
- [89] G. R. Sullivan, J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 2143.
- [90] I. Othani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4092.
- [91] G. Trimurtulu, I. Ohtani, G. L. M. Patterson, R. E. Moore, L. Demchik, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4729.
- [92] J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 512.
- [93] E. M. Merckx, L. Vanhoeck, J. A. Lepoivre, F. C. Alderweireldt, B. J. Van Der Veken, J. P. Tollenaere, L. A. Raymaekers, *Spectroscopy* **1983**, 2, 30.
- [94] H. M. Doesburg, G. H. Petit, E. M. Merckx, *Acta Cryst.* **1982**, B38, 1181.
- [95] S. S. Oh, W. H. Butler, M. Koreeda, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4499.
- [96] D. W. Knight, N. Lewis, A. C. Share, D. Haigh, *J. Chem. Soc.* **1998**, *Perkin Trans. 1*, 3673.
- [97] C. Alegret, X. Ginesta, A. Riera, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 10, 1789.
- [98] M. H. Haukaas, G. A. O'Doherty, *Organic Letters* **2001**, 3, 401.

- [99] D. Enders, U. Jegelka, *Synlett* **1992**, 12, 999.
- [100] N. B. Kalamkar, V. M. Kasture, D. D. Dhavale, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 3619.
- [101] H. Takahata, Y. Banba, H. Ouchi, H. Nemoto, A. Kato, I. Adachi, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 3603.
- [102] I. S. Kim, J. S. Oh, O. P. Zee, Y. H. Jung, *Tetrahedron* **2007**, 63, 2622.
- [103] M. C. Noe, J. M. Hawkins, S. L. Snow, L. Woulf-Gouveia, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 3295.
- [104] C. Clerc, J. Matarazzo, P. Rüedi, *Helv. Chim. Acta* **2009**, 92, im Druck.
- [105] C. J. Wilkins, *J. Chem. Soc.* **1951**, 10, 2726.
- [106] Z. H. Lu, W. S. Zhou, *Tetrahedron* **1993**, 49, 4659.
- [107] E. L. Eliel, S. H. Schroeter, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 5031.
- [108] R. K. Prasad, P. Anbarasan, *Tetrahedron* **2007**, 18, 2479.
- [109] Ampac8, copyright, 1992-2004 Semichem, Inc. PO Box 1649, Shawnee, KS 66222.
- [110] M. J. S. Dewar, E. G. Zebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902.
- [111] R.W. Kunz, 'Molecular Modelling für Anwender', Stuttgart, Teubner Verlag, 1997.
- [112] I. Flemming, 'Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions', John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 2005.
- [113] D. G. Gorenstein, R. Rowell, J. Findlay, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5077.
- [114] A. Baici, P. Schenker, M. Wächter, P. Rüedi, *Chemistry & Biodiversity* **2009**, 6, im Druck.
- [115] G. Hart, R. D. O'Brien, *Biochemistry* **1973**, 12, 2940.
- [116] A.R. Main, W. C. Dauterman, *Nature (London)* **1963**, 4880, 551.
- [117] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr., R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88.
- [118] A. Baici, *Biol. Chem.* **1998**, 379, 1007.

- [119] S. E. Szedlacsek, R. G. Duggleby, *Meth. Enzymol.* **1995**, 259, 144.
- [120] L. H. Easson, E. Stedman, *Proc. Roy. Soc. London B* **1936**, 121, 142.
- [121] W. W. Ackerman, V. R. Potter, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **1949**, 72, 1.
- [122] R. Kitz, I. B. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3245.
- [123] W. X. Tian, C. L. Tsou, *Biochemistry* **1982**, 21, 1028.
- [124] C. L. Tsou, *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* **1988**, 61, 381.
- [125] P. J. Gray, R. G. Duggleby, *Biochem. J.* **1989**, 257, 419.
- [126] K. F. Tipton, Ed. M. Sandler, 'Enzyme Inhibitors as Drugs', McMillan, London, 1980, S. 1.
- [127] C. M. Topham, *J. Theor. Biol.* **1990**, 145, 547.
- [128] G. Schwarz, *The Annals of Statistics* **1978**, 6, 461.
- [129] K. Jaqaman, G. Danuser, *Molecular Cell Biology* **2006**, 7, 813.
- [130] A. R. Main, *Science* **1964**, 114, 992.
- [131] H. A. Berman, K. Leonard, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 3942.
- [132] H. A. Berman, M. M. Decker, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 3951.
- [133] H. A. Berman, K. Leonard, *J. Biochemistry* **1990**, 29, 10640.
- [134] A. C. M. v. d. Drift, H. C. Beck, W. H. Dekker, A. G. Hulst, E. R. J. Wils, *Biochemistry* **1985**, 24, 6894.
- [135] R. S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem.* **1966**, 8, 413.
- [136] S. Budavari, M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman, 'The Merck Index, an Encyclopedia of chemicals, and Biologicals - Eleventh Edition', Merck Co., Inc. Rahway, NJ, 1989.
- [137] C. K. Johnson, 'ORTEPII, Report ORNL-5138', Oak Ridge, Tennessee, 1976.
- [138] P. Rovnaník, Z. Zák, and M. Cerník, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2006**, 632, 1356.
- [139] U. Schülke und R. Kayser, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1991**, 600, 221.
- [140] A. Krezel, W. Bal, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 98, 161.
- [141] H.D. Flack, G. Bernardinelli, *Acta Crystallogr., Sect A* **1999**, 55, 908.
- [142] H.D. Flack, G. Bernardinelli, *J. Appl. Crystallogr.* **2000**, 33, 1143.

12. DANK

Meinem Doktorvater Prof. Dr. PETER RÜEDI für sein uneingeschränktes Vertrauen. Die vielen Gespräche über die Wissenschaft und das Leben als solches waren stets eine grosse Unterstützung und haben meine Zeit während der Dissertation sehr bereichert. Ich danke ihm von ganzem Herzen.

Prof. Dr. JOHN A. ROBINSON für die Übernahme des Vorsitzes im Promotionskomitee.

Prof. Dr. Jay S. Siegel für die Mitwirkung im Promotionskomitee.

Dr. CHRISTIAN CLERC, Dr. MARKUS STÖCKLI, Dr. STEFAN FUREGATI, Dr. DENIZ TAŞDEMİR, FRANK ROGANO, BENNO BISCHOF, PETER ÜBELHART und MARTIN SEYFRIED für die angenehme Arbeitsatmosphäre während der Dissertation, für ihre Hilfsbereitschaft und für die vielen lustigen Stunden während und auch nach der Arbeit.

Prof. Dr. ANTONIO BAICI und PATRICIA SCHENKER für ihre Zusammenarbeit. Es war sehr inspirierend und hat viel Spass gemacht.

Dr. R. W. KUNZ für seine Unterstützung und die vielen interessanten Gespräche über "Computerchemie".

Dr. ANTHONY LINDEN und SASHA BLUMENTRITT für ihre Geduld und ihren hervorragenden Röntgenstrukturanalyse-Service.

SIMON JURT, NADJA BROSS und Prof. Dr. OLIVER ZERBE für ihre Hilfe bei meinen zahlreichen und langwierigen NMR-Experimenten.

WILLY EISELE und DANIEL SCHNARWILER für alle Reparaturen und die zum Teil genialen

Neuanfertigungen aus der Mechanikerwerkstatt und aus der Glasbläserei.

Den Mitarbeitern des Materialdienstes der Uni Zürich.

Dem schweizerischen Nationalfonds und dem Kanton Zürich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Meinem Vater FREDY WÄCHTER fürs Korrekturlesen.

Meinen Eltern GABY und FREDY WÄCHTER, die mich immer unterstützen und mir ihr grenzenloses Vertrauen schenken.

Meiner Frau SONIA CHIOFALO WÄCHTER, die mich mit ihrer aufgestellten Art und mit ihrem sonnigen Gemüt auch in schwierigen Zeiten voll unterstützt.

13. LEBENSLAUF

Name:		Wächter
Vorname:		Michael
Geburtsdatum:		7. April 1980
Heimatort:		Unterbözing AG
Zivilstand:		verheiratet
Nationalität:		Schweizer
Ausbildung:	08/1996 - 10/2000	Kantonsschule Wettingen AG
		Typus PSG
	10/2001 - 04/2006	Studium in Chemie
		Universität Zürich, Diplom
Diplomarbeit:		Titel: Herstellung optisch aktiver Organophosphate mit <i>cis</i> - und <i>trans</i> - Decalingerüst zur Untersuchung der Inhibition von Acetylcholinesterase
Dissertation:	04/2006 - 03/2009	Universität Zürich, unter der Leitung von Prof. Dr. P. RÜEDI Vorsitzender des Promotionskomitees: Prof. Dr. JOHN A. ROBINSON
Sonstiges:	10/2000 - 10/2001	Arbeit als Tennislehrer im Sportzentrum WASE in Birrhard AG